



Liliane Pereira Raposo

Licenciada em Bioquímica

Internalização e Citotoxicidade de Sodalites e Nano-sodalites Luminescentes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Doutor César A. T. Laia
Co-orientadora: Doutora Alexandra Fernandes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2018

Internalização e Citotoxicidade de Sodalites e Nano-sodalites Luminescentes

Copyright © Liliane Pereira Raposo, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Doutor César António Tonicha Laia por esta oportunidade, pelo apoio e por todos os ensinamentos partilhados, não só laboratoriais como de vida. À Professora Alexandra Fernandes por me ter aceite no seu grupo de investigação, pela disciplina e por todo o apoio e orientação que me proporcionou ao longo deste ano.

À Doutora Andreia Ruivo, ao Professor Doutor Pedro Viana Baptista, ao investigador Tiago Moreira e à Doutora Sandra Gago pelo conhecimento partilhado, pela simpatia e pelo tempo disponibilizado para todas as questões que surgiram ao longo deste projeto. À Doutora Catarina Rodrigues pelo ensinamento de novas técnicas e por conseguir encaixar-me no pouco tempo que tinha disponível. À Professora Doutora Maria Isabel Cardoso por me orientar na microscopia de luz polarizada e por estar sempre disponível para mim.

Aos investigadores de Leuven por me permitirem pertencer neste projeto emocionante e por me disponibilizarem o nano-zeólito LTA-4A. Ao grupo da VICARTE por me permitir usar os seus recursos para a síntese e caracterização das sodalites e nano-sodalites. A todos os elementos do grupo de fotoquímica e dos laboratórios do 315 e 316 pela boa disposição, pelo apoio e conselhos partilhados. À Joana Almeida minha colega de laboratório, confidente e amiga que tornou tudo mais divertido.

Ao meu colega, amigo e companheiro Rúben Diogo Marques da Silva que me acompanhou nas noites sem dormir e me ajudou prontamente sempre que necessitei, fosse a nível académico como a nível pessoal.

À minha mãe Maria Raposo que, longe e há maneira dela, apoio-me nesta aventura, continuou a acreditar em mim. Ao meu pai Manuel Raposo que, antes de partir, fez-me prometer que concluiria os estudos. É graças a eles que cheguei aqui e pretendo continuar a seguir o meu caminho. Ao meu irmão Simão Inácio e a todos os meus amigos que me aturaram quando eu estava obcecada com a tese.

Obrigado a todos pelo contributo na minha vida e por me terem feito uma pessoa melhor.

Resumo

As sodalites e nano-sodalites são aluminossilicatos conhecidos pela sua estabilidade química e pela capacidade de encapsular pequenos *clusters* ou iões. Os *clusters* são pequenos agregados de átomos que ao serem encapsulados em matrizes zeolíticas podem conferir novas funcionalidades. A espécie Se_2^- , cuja luminescência se encontra na gama do vermelho, é apropriada para aplicações em microscopia de fluorescência.

Esta dissertação teve como objetivo avaliar a viabilidade das sodalites e nano-sodalites de selénio como possíveis marcadores de fluorescência. Foi necessário otimizar a síntese das sodalites funcionalizadas, caraterizar a sua estrutura, propriedades luminescentes e avaliar a sua citotoxicidade. A luminescência foi determinada por espetroscopia de absorção UV-Vis, por espetroscopia de fluorescência e pela determinação da Eficiência Quântica Externa e da intensidade de brilho. De forma a facilitar a internalização celular destes aluminossilicatos, estes foram funcionalizados com APTES ((3-aminopropil)triétoxissilano). Este silano contém um grupo amina terminal que confere carga positiva à superfície da sodalite. Com este trabalho foi possível obter sodalites e nano-sodalites funcionalizadas com luminescência elevada e com reduzida citotoxicidade, caraterísticas encorajadoras para futuras aplicações na área da biomedicina.

Termos Chave: Aluminossilicatos, Brilho, Citotoxicidade, *Clusters*, Luminescência, Microscopia de fluorescência, Nano-sodalites.

Abstract

Sodalites and nano-sodalites are aluminosilicates known for their chemical stability and the ability to encapsulate small clusters or ions. Clusters are small aggregates of atoms that when encapsulated in zeolite matrices can confer new functionalities. The Se_2^- species, whose luminescence is in the red wavelength range, is suitable for applications in fluorescence microscopy.

This dissertation aimed to evaluate the viability of selenium sodalites and nano-sodalites as possible fluorescence markers. It was necessary to optimize the synthesis of functionalized sodalites, characterize their structure, luminescent properties and evaluate their cytotoxicity. Luminescence was determined by UV-Vis absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy and determination of the external quantum efficiency and brightness intensity. In order to facilitate the cellular internalization of these aluminosilicates, they were functionalized with APTES ((3-aminopropyl) triethoxysilane). This silane contains a terminal amine group which imparts a positive charge to the surface of sodalite. With this work was possible to obtain functionalized sodalites and nano-sodalites with high luminescence and with reduced cytotoxicity, encouraging characteristics for future applications in the area of biomedicine.

Keywords: Aluminosilicates, Brightness, Cytotoxicity, Clusters, Luminescence, Fluorescence microscopy, Nano-sodalites.

Índice

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
ÍNDICE	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIV
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ZEÓLITOS E AS SUAS PROPRIEDADES	1
1.1.1. <i>Composição de Zeólitos</i>	<i>1</i>
1.1.2. <i>Zeólito LTA -4A e as suas Caraterísticas.....</i>	<i>2</i>
1.1.3. <i>Conversão de Zeólito LTA em Sodalite</i>	<i>3</i>
1.1.4. <i>Zeólitos Luminescentes.....</i>	<i>4</i>
1.2. VERSATILIDADE QUÍMICA DOS ZEÓLITOS	5
1.2.1. <i>Aplicações de zeólitos em Sistemas Biológicos.....</i>	<i>5</i>
1.2.1.1. <i>Libertação de Fármacos.....</i>	<i>5</i>
1.2.1.2. <i>Microscopia de Fluorescência.....</i>	<i>6</i>
1.2.2. <i>Funcionalização de Zeólitos</i>	<i>7</i>
1.2.3. <i>Toxicidade de Zeólitos.....</i>	<i>8</i>
1.3. OBJETIVO	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS	10
2.1. SÍNTESE DE SODALITES E NANO-SODALITES DE SELÊNIO	10
2.2. CARATERIZAÇÃO DAS SODALITES	11
2.2.1. <i>Difração de Raios-X.....</i>	<i>11</i>
2.2.2. <i>Fluorescência de Raios-X.....</i>	<i>11</i>
2.2.3. <i>Microscopia de Luz Polarizada.....</i>	<i>11</i>
2.2.4. <i>Espetroscopia de Reflectância Difusa</i>	<i>12</i>
2.2.5. <i>Espetroscopia de Fluorescência</i>	<i>12</i>
2.2.5.1. <i>Espetros 3D e Espetros de Fluorescência da sodalite</i>	<i>12</i>
2.2.5.2. <i>Eficiência Quântica Externa</i>	<i>12</i>
2.3. FUNCIONALIZAÇÃO DAS SODALITES.....	12
2.4. CARATERIZAÇÃO DAS SODALITES FUNCIONALIZADAS.....	13
2.4.1. <i>Análise Elementar</i>	<i>13</i>

2.4.2.	<i>Caraterização Espetoscópica</i>	13
2.5.	ESTERILIZAÇÃO E SOLUBILIZAÇÃO DAS SODALITES E NANO-SODALITES	13
2.6.	ENSAIOS BIOLÓGICOS	14
2.6.1.	<i>Crescimento e Manutenção da Linhagem Celular</i>	14
2.6.2.	<i>Ensaio de Viabilidade Celular</i>	15
2.6.3.	<i>Avaliação da internalização da sodalite e nano-sodalite</i>	16
2.6.4.	<i>Ensaio de Microscopia de Fluorescência</i>	16
2.6.4.1.	Microscópio Invertido.....	16
2.6.4.2.	Microscópio de Fluorescência Convencional	17
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3.1.	SÍNTESE DAS SODALITES E NANO-SODALITES DE SELÊNIO	18
3.2.	CARATERIZAÇÃO DAS SODALITES SINTETIZADAS	19
3.2.1.	<i>Difração de Raios-X</i>	19
3.2.2.	<i>Fluorescência de Raios-X</i>	20
3.2.3.	<i>Espetroscopia de Reflectância Difusa</i>	23
3.2.4.	<i>Espetroscopia de Fluorescência</i>	24
3.2.4.1.	Espetros 3D.....	24
3.2.4.2.	Espetroscopia de Fluorescência, Eficiência Quântica Externa e Brilho	25
3.2.5.	<i>Dimensões das partículas da sodalite</i>	28
3.3.	FUNCIONALIZAÇÃO	29
3.3.1.	<i>Caraterização das sodalites funcionalizadas</i>	29
3.3.1.1.	Análise Elementar	29
3.3.1.2.	Caraterização Espetoscópica	30
3.3.1.3.	Espetroscopia Absorção e de Fluorescência	30
3.3.1.4.	Eficiência Quântica Externa e Brilho das sodalites	31
3.3.1.5.	Dimensões das partículas da sodalite funcionalizadas	32
3.4.	SÍNTESE DAS NANO-SODALITE.....	32
3.5.	CARATERIZAÇÃO DAS NANO-SODALITES	33
3.5.1.	<i>Difração de Raios-X</i>	33
3.5.2.	<i>Dimensões da Nano-sodalite</i>	34
3.5.3.	<i>Análise Elementar</i>	36
3.5.4.	<i>Caraterização Fotoquímica das nano-sodalites</i>	36
3.5.4.1.	Espetroscopia de absorção e de fluorescência	36
3.5.4.2.	Eficiência Quântica Externa e Brilho	38
3.6.	ESTERILIZAÇÃO E SOLUBILIZAÇÃO DE SODALITES	39
3.7.	ENSAIOS BIOLÓGICOS	40
3.7.1.	<i>Internalização celular</i>	40
3.7.2.	<i>Viabilidade Celular</i>	40

3.7.3.	<i>Microscopia de Fluorescência</i>	42
4.	CONCLUSÃO	45
5.	BIBLIOGRAFIA	49
6.	ANEXOS	52

Índice de Figuras

FIGURA 1. EXEMPLOS DE ZEÓLITOS CONSTITUÍDOS PELAS GAIOLAS B.....	1
FIGURA 2 ESTRUTURA DO ZEÓLITO LTA E DA SODALITE.....	3
FIGURA 3. COMPARAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DOS ÁTOMOS DA ESTRUTURA CRISTALINA DO LTA, DA SODALITE E DA NEFELINA.	4
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE SILANIZAÇÃO.	7
FIGURA 5. ESTRUTURA QUÍMICA DO SILANO (3-AMINOPROPI)TRIETOXISILANO (APTES).....	8
FIGURA 6. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA REDUÇÃO DO MTS EM FORMAZANO.	9
FIGURA 7. COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOQUÍMICAS DAS SODALITES DE SELÊNIO SINTETIZADAS.....	18
FIGURA 8. ESPETROS DE DRX DAS SODALITES DE SELÊNIO SINTETIZADAS.	20
FIGURA 9. ESPETROS DE FRX DAS SODALITES SINTETIZADAS.	21
FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA EVOLUÇÃO DOS RÁCIOS RESULTANTES DA ANÁLISE DOS ESPETROS DE FRX EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE ESTEQUIOMÉTRICA DE SELÊNIO NA SODALITE	22
FIGURA 11. ESPETRO DE ABSORÇÃO DAS SODALITES SINTETIZADAS, OBTIDO PELA APLICAÇÃO DA LEI DE KUBELKA –MUNK.	23
FIGURA 12. VARIAÇÃO DA INTENSIDADE DOS PICOS DE ABSORÇÃO EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE ESTEQUIOMÉTRICA DE SELÊNIO DE CADA SODALITE	23
FIGURA 13. ESPETROS 3D DAS SODALITES X=0,2 (A) E X=1,2 (B) SINTETIZADAS.	25
FIGURA 14. COMPORTAMENTO DA LUMINESCÊNCIA DAS SODALITES.....	26
FIGURA 15. RELAÇÃO ENTRE EFICIÊNCIA QUÂNTICA EXTERNA (A) E O BRILHO (B) COM AS QUANTIDADES ESTEQUIOMÉTRICAS DE SELÊNIO NAS SODALITES SINTETIZADAS.....	27
FIGURA 16. DIMENSÕES DAS PARTÍCULAS DA SODALITE.	28
FIGURA 17. EVOLUÇÃO DO RÁCIO N/C EM FUNÇÃO DO TEMPO DE SILANIZAÇÃO.....	30
FIGURA 18. ESPETROS DE ABSORÇÃO (A) E DE FLUORESCÊNCIA (B) DAS SODALITES DE SELÊNIO X=0,1, COM DIFERENTES TEMPOS DE FUNCIONALIZAÇÃO COM APTES.....	31
FIGURA 19. VARIAÇÃO DA EFICIÊNCIA QUÂNTICA EXTERNA (A) E DO BRILHO (B) DA SODALITE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE SILANIZAÇÃO	31
FIGURA 20. RELAÇÃO ENTRE AS DIMENSÕES DAS PARTÍCULAS DA SODALITE NÃO FUNCIONALIZADA (F0, BARRAS AZUIS) E FUNCIONALIZADA (F3, BARRAS VERMELHO).....	32

FIGURA 21. NANO-SODALITE E SODALITE (X=0,1) NÃO FUNCIONALIZADAS, EXPOSTAS À LUZ SOLAR E À LUZ UV (λ EXCITAÇÃO = 366 NM).....	33
FIGURA 22. ESPETRO DE DRX DA NANO-SODALITE DE SELÊNIO	34
FIGURA 23. DIMENSÕES DAS PARTÍCULAS DAS NANO-SODALITES SINTETIZADAS.	34
FIGURA 24. RELAÇÃO ENTRE A ÁREA DAS PARTÍCULAS DAS NANO-SODALITES NÃO FUNCIONALIZADA (F0) E FUNCIONALIZADA (F3) E A FRAÇÃO POPULACIONAL AVALIADA..	35
FIGURA 25. ESPETRO DE ABSORÇÃO (A) E DE FLUORESCÊNCIA (B) DAS SODALITES E DAS NANO-SODALITES NÃO FUNCIONALIZADA.....	37
FIGURA 26. ESPETROS DE ABSORÇÃO (A) E DE FLUORESCÊNCIA (B) DAS NANO-SODALITES.).	38
FIGURA 27. ESPETROS DE FLUORESCÊNCIA DAS SODALITES F3 NOS FIBROBLASTOS (LINHA VERMELHA) E NO MEIO DE CULTURA (LINHA AZUL).	40
FIGURA 28. VIABILIDADE CELULAR DOS FIBROBLASTOS APÓS EXPOSIÇÃO A DIFERENTES SODALITES.	41
FIGURA 29. VIABILIDADE CELULAR DOS FIBROBLASTOS APÓS 48 HORAS DE INCUBAÇÃO COM A SOLUÇÃO DE SODALITE E NANO-SODALITE, EM DMEM, À CONCENTRAÇÃO DE 0,3 MG/ML.....	42
FIGURA 30. IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA RESULTANTES DA INCUBAÇÃO DE SODALITE FUNCIONALIZADA COM FIBROBLASTOS, DURANTE 6, 22 E 48 HORAS.	43
FIGURA 31. IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA RESULTANTES DA INCUBAÇÃO DE NANO-SODALITES FUNCIONALIZADAS EM FIBROBLASTOS, DURANTE 6, 22 E 48 HORAS.	45

Índice de tabelas

TABELA 1. VARIANTES DO ZEÓLITO LTA TENDO EM CONTA O CATIÃO ESTABILIZADOR, O DIÂMETRO DO PORO E A SUA CAPACIDADE DE EXCLUSÃO.....	2
TABELA 2. NOMENCLATURA DAS SODALITES DE SELÊNIO X=0,1 FUNCIONALIZADAS COM APTES.	29
TABELA 3. COMPARAÇÃO ENTRE OS RÁCIOS N/C OBTIDOS PARA AS NANO-SODALITES E PARA AS SODALITES, FUNCIONALIZADAS (F3) E NÃO FUNCIONALIZADAS (F0).	36
TABELA 4. EFICIÊNCIA QUÂNTICA EXTERNA (%) E BRILHO DAS SODALITES E NANO-SODALITES, NÃO FUNCIONALIZADAS (F0) E FUNCIONALIZADAS DURANTE 3 HORAS (F3).	38
TABELA 5. CONCENTRAÇÃO MÁSSICA OBTIDA PARA DIFERENTES SOLUBILIZAÇÕES DAS FUNCIONALIZAÇÕES DA SODALITE E NANO-SODALITE.....	39

Índice de abreviaturas e símbolos

λ - Comprimento de onda

APTES – (3-aminopropil)triétoxissilano

CPT - camptotecina

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO - Dimetilsulfóxido

DRX – Difração de Raio-X (*X-Ray Diffraction*)

EQE – Eficiência Quântica Externa (*External Quantum Efficiency*)

FBS – Soro Fetal de Bovino (*Fetal Bovine Serum*)

FRX – Fluorescência de Raio-X (*X-Ray Fluorescence*)

KM – Kubelka-Munk

LTA – Linde Tipo A

MTS - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

OD – Densidade Ótica (*Optic Dencity*)

PEG – Polietilenoglicol

PBS – Tampão Fosfato-Salino (*Phosphate Buffered Saline*)

RD – Reflectância Difusa (*Diffuse Refectance Spectroscopy*)

SOD – Sodalite

TE – Tripsina-EDTA

1. Introdução

1.1. Zeólitos e as suas Propriedades

1.1.1. Composição de Zeólitos

Os zeólitos são aluminossilicatos cristalinos compostos por tetraedros de AlO_4 e de SiO_4 , interligados pela partilha de átomos de oxigénio.^[1-4] Pela interação entre vários tetraedros é possível formar diversas estruturas unitárias cristalinas, fortes e definidas, como a gaiola β , também conhecida como gaiola sodalite.^[1-4] As gaiolas β podem combinar-se entre si ou com outras estruturas formando diferentes tipos de zeólitos, como a faujasite, o LTA e a sodalite, que estão representadas na **Figura 1**.^[1-4] Devido à presença dos átomos de alumínio nos tetraedros da gaiola β , esta estrutura apresenta carga negativa e, por isso, é necessário compensar a carga da estrutura com cátions externos.^[2-8] Estes cátions estão coordenados com os tetraedros do zeólito e podem permutar de forma natural com outros cátions.^[2-8]

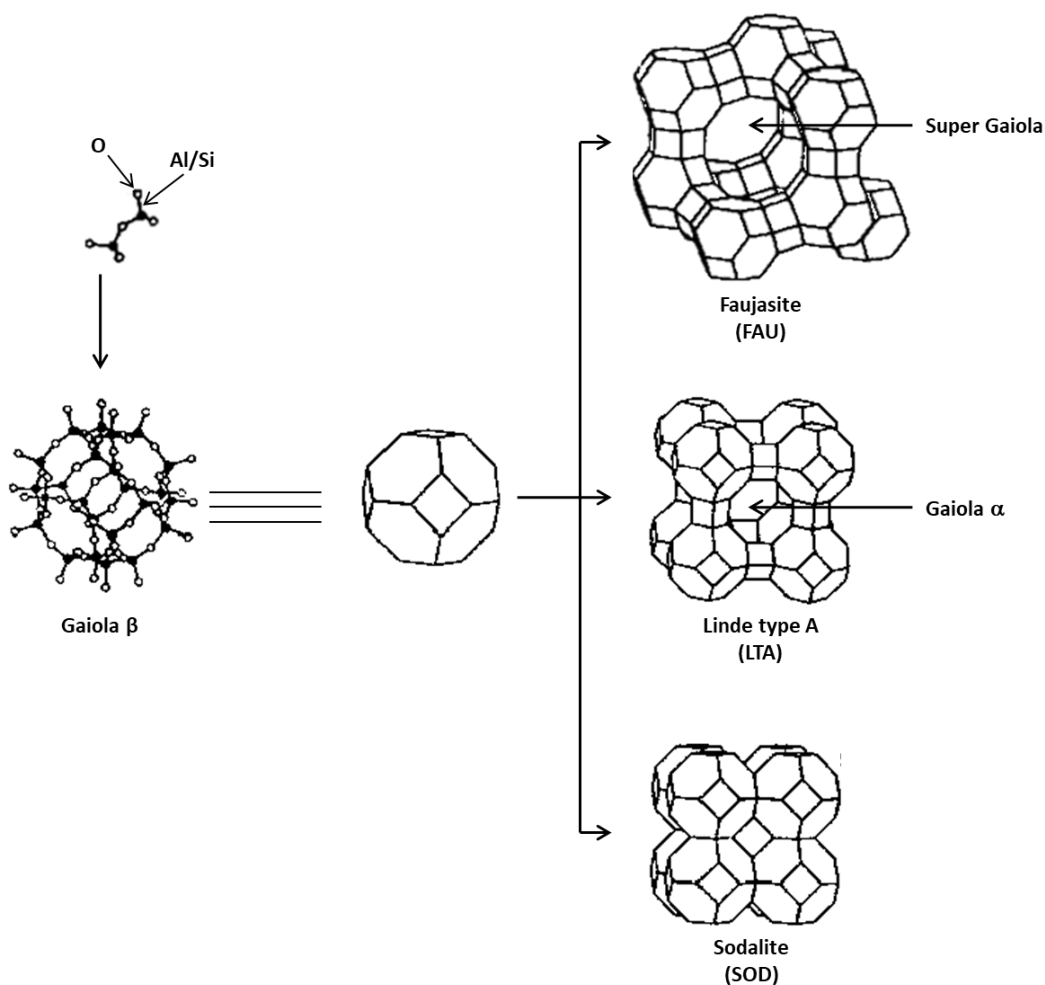


Figura 1. Exemplos de zeólitos constituídos pelas gaiolas β . Nesta figura estão representados os zeólitos Sodalite (SOD), Linde Type A (LTA) e a Faujasite (FAU), bem como a estrutura tridimensional da própria gaiola β . Adaptado de [2].

Os zeólitos são materiais conhecidos pela sua elevada porosidade.^[1-10] A porosidade de um zeólito resulta de uma combinação tridimensional específica entre as várias estruturas unitárias de modo a formar uma estrutura interna.^[2-6] O acesso ao espaço intra-cristalino é fácil e depende das dimensões dos anéis de T – O – T, em que T pode ser um átomo de alumínio ou silício. Quanto mais tetraedros compuserem os anéis, maior será o poro e mais fácil será a entrada e saída de moléculas.^[2-6] Algumas dessas moléculas são encapsuladas no interior dos zeólitos e alteram as suas propriedades espectroscópicas.^[2-6]

Para além da porosidade, outro fator que influencia a estrutura tridimensional dos zeólitos é o rácio Si/Al.^[2-4] Este rácio depende das condições de síntese do zeólito e condiciona as suas propriedades estruturais, como a termoestabilidade e a hidrofobicidade.^{[2][4]} Os zeólitos com um rácio Si/Al elevado (ricos em sílica) conseguem suportar temperaturas até 1300 °C e são mais hidrofóbicos, enquanto zeólitos pobres em sílica (rácio Si/Al=1) apresentam alterações estruturais a partir de 700°C.^{[2][4]} Devido às repulsões eletrostáticas que se formam entre as cargas negativas dos tetraedros, o rácio Si/Al nunca é inferior a 1.^{[2][4][11]} Quando o rácio é menor que 1 a estrutura é reorganizada e formam-se os silicatos, composto exclusivamente por sílica (SiO₂).^[2] Pela variação do rácio de Si/Al, a concentração de catiões estabilizadores no zeólito é influenciada. Quanto maior a presença de alumínio na estrutura, menor é o rácio Si/Al do zeólito e mais catiões estabilizadores são necessários para a estabilização da estrutura.^[2] Pela combinação das diferentes estruturas unitárias e pela variação do rácio Si/Al é possível formar diferentes zeólitos. De entre os vários zeólitos conhecidos o zeólito LTA é o mais propício para a síntese de sodalites, devido à sua semelhança estrutural^{[1][11]}, e como tal este será o zeólito em *focus*.

1.1.2. Zeólito LTA -4A e as suas Caraterísticas

O zeólito LTA (Linde Type A) é um zeólito sintético constituído por oito gaiolas β ligadas pela estrutura d4r.^{[1][2][11]} Pela combinação tridimensional destas estruturas forma-se uma estrutura interna, a gaiola α (**Figura 1**).^{[1][2][11]} As dimensões da gaiola α do zeólito LTA dependem dos catiões estabilizadores, presentes na estrutura (gaiola β).^[2] Na **Tabela 1** é possível observar a influência do tipo de catião presente no zeólito LTA sobre o diâmetro do poro e, conseqüentemente, sobre a capacidade de exclusão molecular.^{[1][2]} O zeólito LTA – 4A, cuja unidade repetitiva é definida como Na₆(AlSiO₄)₆, apresenta um rácio de Si/Al igual a 1.^{[1][2][4][11]} Sendo um zeólito pobre em sílica, apresenta baixa hidrofobicidade, baixa resistência a ácidos e instabilidade a temperaturas elevadas.^{[1][2][11]}

Tabela 1. Variantes do zeólito LTA tendo em conta o catião estabilizador, o diâmetro do poro e a sua capacidade de exclusão.^{[1][2]}

Zeólito LTA	Catão	Diâmetro do poro (Å)	Capacidade de exclusão
3 A	K ⁺	3	Remove moléculas de água de álcoois e alcanos
4 A	Na ⁺	4	Separa moléculas de dióxido de carbono de moléculas de metano
5 A	Ca ²⁺	4,7	Separa n-alcanos de alcanos

Devido à semelhança estrutural entre o zeólito LTA-4A e a sodalite (**Figura 1**) e a instabilidade do zeólito LTA-4A a temperaturas elevadas é possível converter este zeólito em sodalite pelo método de síntese sólida. ^{[1][2][11]}

1.1.3. Conversão de Zeólito LTA em Sodalite

A sodalite (SOD) é um aluminossilicato cristalino cuja estrutura é definida como $\text{Na}_8(\text{AlSiO}_4)_6\text{Cl}_2$. ^{[1][11-14]} Este aluminossilicato foi descoberto em Greenland por Karl Ludwig von Giesecke, em 1806, mas a sua estrutura apenas foi determinada por Pauling, em 1930. ^{[11][13]} A sua estrutura cristalina da sodalite é constituída por 9 gaiolas β (gaiolas de sodalite) interligadas (**Figura 1**). ^{[1][11][13]} Dentro de cada gaiola β existe um anião de cloro coordenado tetraedricamente com os cátions de sódio. ^{[1][11][13]}

Em termos de porosidade as sodalites apresentam uma dimensão de poro inferior à de qualquer outro zeólito, sendo por isso uma excelente opção para o encapsulamento de pequenas moléculas, iões ou *clusters*. ^{[11][12]} As aplicações mais comuns para as sodalites são na área industrial como pigmentos azuis e na síntese de nano-compósitos ^[11], contudo novas aplicações na área de biomedicina, nomeadamente em sistemas de dispersão de fármacos, tem sido amplamente desenvolvidas. ^{[11][14]}

Estruturalmente o zeólito LTA-4A é extremamente semelhante à sodalite (SOD), sendo bastante fácil converter o LTA-4A em SOD. ^{[1][2][11]} Ao sujeitar o zeólito LTA-4A a temperaturas acima dos 800 °C, a ligação entre as gaiolas β do LTA é destruída. Assim, a estrutura do zeólito colapsa e uma nova espécie é formada, o carnegiete. Pela cristalização do carnegiete é possível encapsular os iões de cloro formando a sodalite. ^[11] Devido à partilha de oxigénios entre as diferentes gaiolas β , a estrutura da Sodalite é mais estável que a estrutura do LTA-4A. ^{[11][15]} Na **Figura 2** é comparada a estrutura do zeólito LTA e da sodalite.

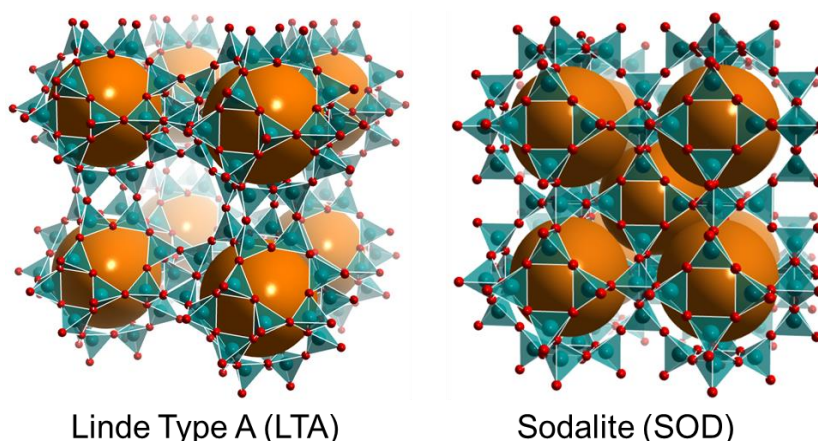


Figura 2 Estrutura do zeólito LTA e da sodalite. Os tetraedros de TO_4 ($\text{T}=\text{Al}$ ou Si) são representados de azul com os átomos dos vértices (Al , Si ou O) a vermelho. As esferas azuis no interior dos tetraedros representam o cátion estabilizador de carga. As grandes esferas cor-de-laranja são representativas do interior da gaiola β . Esta figura foi adaptada a partir da base de dados CHEMICAL STRUCTURE: LINDE TYPE à (esquerda) e SODALITE (direita).

Durante o processo de cristalização da sodalite pode formar-se um subproduto, a nefelina.^{[11][15]} A estrutura da nefelina é constituída pelos mesmos elementos atômicos que o LTA, contudo estes estão organizados em sistemas hexagonais amorfos.^{[11][15][16]} Devido à falta de cristalinidade, a nefelina não consegue encapsular os aniões de cloro.^{[11][15][16]} As diferenças estruturais entre LTA, SOD e nefelina estão apresentados na **Figura 3**.

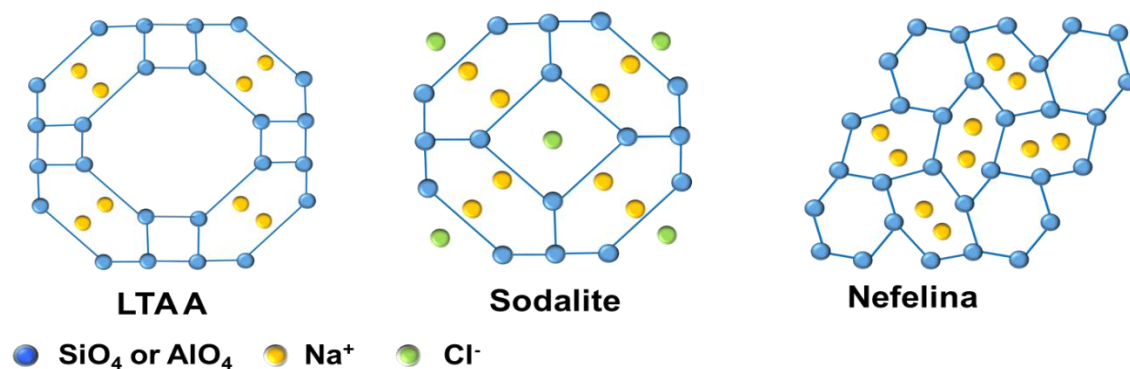


Figura 3. Comparação da organização dos átomos da estrutura cristalina do LTA, da sodalite e da nefelina.

1.1.4. Zeólitos Luminescentes

Para além de iões, os zeólitos têm a capacidade de encapsular pequenas moléculas orgânicas ou pequenos *clusters*.^{[4-9][11-14][17-36]} Os *clusters* são pequenos agregados atômicos, como os policalcogenetos, que determinam as propriedades fotoquímicas do material em que estão inseridos.^{[5][9][12][13][18-21][23-25][33-35]}

Um *cluster* muito estudado em zeólitos é a prata. A prata é um elemento de transição com uma gama de aplicações variadas.^{[4][6][21-24]} Quando encapsulada numa matriz, nomeadamente em zeólitos, a prata confere as suas propriedades químicas ao material em que se encontra presente. Como tal, um zeólito com *clusters* de prata encapsulados no seu interior pode ser utilizado como material antibacteriano ou catalisadores.^{[4][6][21-24]} Em 2009, Eduardo Coutinho-Gonzalez *et al* avaliaram a influência da topologia do zeólito, da carga da prata e do contra ião na cor de luminescência do sistema zeólito-prata.^[24] Para tal utilizaram o zeólito LTA e a faujasite (X e Y), com os contra iões sódio (Na), potássio (K) e cálcio (Ca) e variaram a concentração de prata. Neste estudo eles concluíram que todos estes fatores influenciavam a cor e a intensidade de luminescência dos materiais sintetizados. Por exemplo, as amostras de zeólito LTA-K, com *clusters* de prata, apresentaram luminescência verde a passo que com o contra ião de cálcio (LTA-Ca) a luminescência dependia fortemente da carga da prata encapsulada (quanto maior a carga da prata mais deslocada para o vermelho é a emissão do zeólito).^[24] No caso das sodalites os *clusters* mais comuns são os de enxofre.^{[4][6][12][13][18-20][24]}

Estes *clusters* são encapsulados no interior da gaiola β . Dependendo da espécie de enxofre aprisionada na sodalite, esta apresenta propriedades espectroscópicas diferentes. As propriedades mais estudadas destes *clusters* são o fotocromismo e a fotoluminescência.^{[4][6][12][13][18-20][24]}

O fotocromismo é definido pela capacidade de um material mudar de cor de forma reversível. ^{[13][18][25]} Estudos feitos anteriormente revelaram que, no caso da sodalite a espécie responsável por este efeito é a S_2^{2-} . ^{[13][18][25]} Assim, quando exposta a radiação UV-C (280-100 nm), a sodalite apresenta uma cor rosa ou violeta, que se extingue após esta exposição. ^[25] Por outro lado, a fotoluminescência resulta na emissão de luz, após a absorção de fótons. ^{[12][13][17-21][24][25][27][37]} No caso das espécies de *cluster* X_2^- , em que X=S, Se ou Te, estamos na presença de um estado duplete, em que um eletrão encontra-se desemparelhado. ^{[12][18-20]} Desta forma, as propriedades luminescentes destas espécies devem-se à transição eletrónica da orbital π para a orbital π^* . ^{[12][18-20]} Assim, após excitação da sodalite a 380 nm, esta apresenta numa forte fotoluminescência cor-de-laranja, devido ao pico de emissão aos 650 nm. ^{[12][18-20]}

1.2. Versatilidade química dos Zeólitos

A primeira documentação de zeólitos remete ao ano de 1756 e o seu autor foi o mineralogista Axel Cronstedt. ^{[2][4]} Apesar disso, o grande impulso para o uso de zeólitos só ocorreu em 1950. Esse impulso deveu-se, principalmente, à descoberta de métodos industriais para síntese de zeólitos. ^{[2][4][17]}

Devido à sua elevada estabilidade termoquímica, porosidade e capacidade de captar iões, ao zeólitos são utilizados em diversas aplicações. ^{[2-14][17-36]} Os zeólitos naturais apresentam uma baixa pureza e custo diminuto. ^{[2][4]} Essa combinação faz deste tipo de zeólitos uma excelente escolha para aplicações cuja pureza da matéria não é um fator determinante. Exemplos dessas aplicações são o uso de zeólitos como encapsuladores de elementos radioativos em solos ou águas residuais, como suplementos em ração animal e como aditivos na produção de cimentos. ^{[2][4]}

Por outro lado, os zeólitos sintéticos apresentam graus de pureza superiores aos zeólitos naturais e as suas características estruturais são controladas. ^{[2][4][8][17]} Desta forma são os mais indicados para aplicações nas áreas de investigação, como adsorventes moleculares (*molecular sieves*), captadores de iões e catalisadores de reações de hidrocarbonetos. ^{[2][4][8][17]}

1.2.1. Aplicações de zeólitos em Sistemas Biológicos

Na última década novas aplicações têm sido avaliadas e desenvolvidas para os zeólitos e nano-zeólitos, nomeadamente na área de biomedicina e da biotecnologia. ^{[2-14][17-27][29-36]} Várias aplicações dos zeólitos foram identificadas e englobam a incorporação de zeólitos na produção de biossensores, ^{[8][31][36]} a utilização de zeólitos como agentes desintoxicantes ^{[2][4][8]} e como encapsuladores de radioisótopos para obtenção de imagens de contraste em ressonância magnética. ^{[7][8]} Devido à sua capacidade de encapsular pequenas moléculas e elevada estabilidade química, a aplicação de zeólitos mais estudada é em sistemas de libertação de fármacos. ^{[2][4][8][9][14][29][31]}

1.2.1.1. Libertação de Fármacos

Em termos de aplicações biomédicas, a utilização de zeólitos como veículo para libertação de fármacos têm sido amplamente exploradas. ^{[2][4][8][9][14][29][31]} Para esta aplicação, o fármaco

pode ser encapsulado no interior do zeólito ou adsorvido à sua superfície. ^{[2][4][8][9][14][29][31]} Em 2014, Zhuang *et al.*^[9] analisaram a capacidade do nano-zeólito ZIF-8 como transportador de fármacos. Neste estudo, eles avaliaram a internalização e a citotoxicidade de duas pequenas moléculas encapsuladas neste nano-zeólito em células. A cultura celular utilizada foi a linhagem celular do cancro da mama (MCF-7). As moléculas utilizadas foram a fluoresceína e a camptotecina (CPT), que é conhecida pelo seu efeito anti-tumoral. Recorrendo à microscopia de fluorescência verificou-se que o nano ZIF-8 internalizou nas MCF-7. Pela análise de viabilidade celular das MCF-7 após 12 horas de incubação com nano ZIF-7, com e sem fluoresceína, mostrou-se que a citotoxicidade deste zeólito nesta linhagem celular era reduzida. Por outro lado, quando a linhagem celular foi incubada 24 horas com a CPT, encapsulada nos nano ZIF-8, a viabilidade celular das MCF-7 diminuiu drasticamente. Para a concentração de 1 µM de CPT encapsulada em nano ZIF-7, a viabilidade celular obtida foi aproximadamente 40%. Quando eles incubaram as MCF-7, nas mesmas condições (24 horas e 1 µM de CPT), com CPT livre (não encapsulada) a viabilidade celular aumentou para 80%. Assim, verificou-se que não só os nano-zeólitos fornecem um bom veículo de internalização, como também protegem o fármaco encapsulado de degradação química, permitindo o aumento da sua eficiência terapêutica. Desta forma é possível afirmar que a utilização de zeólitos em novas terapias pode ser vantajosa. ^{[2][4][8][9][14][29][31]}

1.2.1.2. Microscopia de Fluorescência

Outro campo de aplicação de nano-zeólitos é como “marcadores” para técnicas de imagem, nomeadamente para microscopia de fluorescência. ^{[7-9][30][33][34][38]} Esta aplicação deve-se à capacidade dos zeólitos encapsularem espécies luminescentes, como pequenas moléculas ou *clusters*. ^{[4-9][11-14][17-37]}

A microscopia de fluorescência é uma das técnicas de imagem mais utilizadas para o estudo de sistemas biológicos, uma vez que permite diferenciar componentes celulares, sub-celulares e moleculares, em simultâneo. ^{[27][33][38]} Esta técnica baseia-se nas propriedades luminescentes de determinados compostos, como pequenas moléculas orgânicas, que apresentam afinidade para determinados componentes celulares. ^{[27][33][38]} Devido a estas propriedades fluorescentes estes compostos são chamados fluoróforos. Uma vez que apenas os componentes celulares ligados aos fluoróforos são detetados por microscopia de fluorescência, obtêm-se um elevado contraste visual. ^{[27][33][38]}

Os fluoróforos mais utilizados são moléculas orgânicas, como a fluoresceína, a rodamina e as moléculas da família hoechst. ^{[27][38]} Contudo outros fluoróforos podem ser utilizados como os *quantum dots* ou as proteínas fluorescentes. ^{[33][34]} Os *quantum dots* são materiais semicondutores tão pequenos, entre 2 e 6 nm, que têm propriedades óticas e eletrónicas características. ^[33-35] Pela variação do tamanho, forma e material constituinte dos *quantum dots*, as suas propriedades luminescentes podem ser alteradas. ^[34-36]

Apesar de ser uma técnica muito útil para estudos celulares *in vitro*, a microscopia de fluorescência tem as suas limitações. ^{[3][30][31][33][38]} Uma das limitações desta técnica é a perda

de fluorescência do fluoróforo. Há medida que o fluoróforo é exposto à luz de excitação, vai-se degradando e assim perde luminescência. ^{[3][30][31][33][38]} Este efeito é frequentemente observado em microscopia confocal de fluorescência, que utiliza um feixe laser para excitar a amostra. ^[27] Como laser foca a energia de excitação num ponto específico, a resistência à fotodegradação é um fator determinante para a escolha do fluoróforo e as imagens obtidas apresentam uma resolução elevada. ^{[27][28]} Desta forma é necessário ter em conta a estabilidade do fluoróforo que se está a utilizar e o tempo de incidência da radiação sobre a amostra. ^{[3][27][28][30][31][33][38]} É neste ponto que a utilização de zeólitos luminescentes pode apresentar algumas vantagens. ^{[8][9]} Estudos realizados anteriormente revelaram que o encapsulamento das pequenas moléculas orgânicas em zeólitos aumenta a estabilidade química dos fluoróforos. ^{[8][9]} Um exemplo disso é a fluoresceína, que depois de ser encapsulada no zeólito-Y apresentou um aumento notável da sua estabilidade fotoquímica. ^[9]

Em termos de características fotoquímicas, um bom fluoróforo é um composto que apresente um brilho elevado e baixa fotodegradação. ^{[9][27][33-36]} Para além disso, não deve de ser nocivo para as células. ^{[8][9]} Pela avaliação de todas estas características será possível determinar se as nano-sodalites de selénio poderão funcionar como fluoróforo, em sistemas biológicos. ^{[8][9][27][30][33-36]}

1.2.2. Funcionalização de Zeólitos

Para facilitar a internalização celular dos aluminossilicatos estes poderão ser funcionalizados. A funcionalização da superfície destes materiais permite alterar determinadas propriedades, como a hidrofobicidade, a carga da superfície e a reatividade de um material, sem afetar a sua estrutura interna. ^{[5][6][8][9][14][17][32][36]} O método mais utilizado para a funcionalização de materiais como os zeólitos, é a silanização. Este procedimento é simples, eficaz e pode ser realizado com equipamento comum. ^[6] A silanização consiste em três passos (**Figura 4.**): 1) Hidrólise do silano; 2) Interação do grupo silanol (Si-OH), do silano, com o grupo hidroxilo (OH) da superfície do material e 3) Condensação do silano com a superfície do material, com a libertação de moléculas de água. ^{[17][39]}

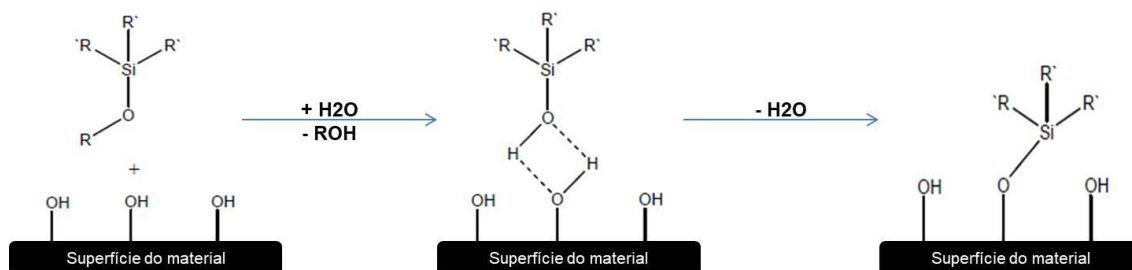


Figura 4. Representação esquemática da reação de silanização. Esta figura foi adaptada a partir do artigo referenciado em [17].

A eficiência de silanização depende do tempo e da temperatura de reação, do solvente utilizado e da concentração do silano em solução. ^[39] Se o solvente tiver excesso de água pode ocorrer uma reação de polimerização, resultando num revestimento formado por múltiplas

camadas de silano. Contudo se não houver água em solução o revestimento pode ser incompleto. ^[39] Elevadas concentrações de silano ou longos tempos de reação também podem conduzir a formação de policamadas de silano. Neste caso, a formação de policamadas de silano deve-se à capacidade de reação entre os diferentes grupos funcionais do silano. ^{[6][8][17][39]}

Na silanização de zeólitos, o silano mais utilizado é o APTES ((3-aminopropil)triethoxisilano). ^{[6][8][17][39]} Como se pode observar na **Figura 5**, este silano é composto por um grupo amina (-NH₂) e três grupos etoxi (-OCH₂CH₃). A presença de três grupos etoxi no APTES permite múltiplas ligações à superfície do zeólito. ^{[6][8][17][39]}

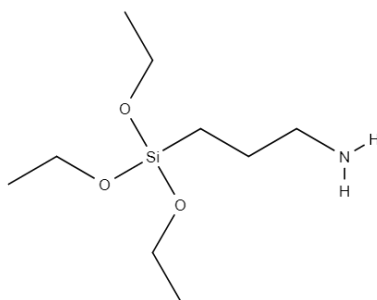


Figura 5. Estrutura química do silano (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES). Esta estrutura foi desenhada no MolView.

Neste trabalho a utilização do APTES tem como objetivo não só aumentar a solubilidade da sodalite, como facilitar a sua internalização celular. Devido ao pKa (~10) ^[37] do grupo amina, em condições fisiológicas (pH 7,4), o APTES possui carga positiva. Uma vez que o interior celular tem carga negativa, a adição de um composto carregado positivamente ao zeólito facilita a sua internalização na célula. ^{[6][8][17][37][39]}

1.2.3. Toxicidade de Zeólitos

A partir do momento em que qualquer composto é sintetizado para aplicações biológicas a avaliação da sua toxicidade é obrigatória. ^{[4][8][9][14][29][31][39]} A toxicidade de uma substância ou composto é definida pela sua capacidade de produzir um efeito nocivo em qualquer sistema biológico. Quando se avalia a toxicidade em células, esta é designada citotoxicidade. ^{[4][8][9][14][29][31][38]}

Vários estudos já foram realizados para avaliar a citotoxicidade dos nano-zeólitos e em todos eles a conclusão final foi a mesma: os nano-zeólitos, por si só, não apresentam citotoxicidade significativa. ^{[4][8][9][14][29][31][32][39]} Em 2016, Męczyńska-Wielgosz *et al.* ^[8] avaliaram a influencia do revestimento da superfície dos nano-zeólitos na sua citotoxicidade. Foram avaliados dois agentes de revestimento: o PEG e o silano. A citotoxicidade dos zeólitos revestidos foi analisada em células embrionárias humanas de rim (HEK-293). Desta forma, Męczyńska-Wielgosz *et al* verificaram-se que o revestimento não influencia a citotoxicidade deste zeólitos.

A via mais utilizada para a determinação da viabilidade celular é pela redução do tetrazólio.^[40] O tetrazólio é uma família de compostos cuja redução produz o formazano. Como apenas as células vivas tem a capacidade de degradar o tetrazólio é possível quantificar a percentagem de células viáveis.^[40] A quantificação do formazano em solução é determinada por espectroscopia de absorção UV-Vis. Existem quatro variantes do tetrazólio: o MTT, o XTT, o WST-1 e o MTS.^[40] O MTT tem carga positiva e, como tal, entra facilmente nas células, sendo reduzido no interior celular. O XTT, o WST-1 e o MTS têm carga negativa e não internalizam tão facilmente. Desta forma, é necessário um mediador de eletrões que transfere os eletrões do citoplasma, ou da membrana plasmática, para um desses reagentes.^[40] Na **Figura 6**, encontra-se apresentado a redução do MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) em formazano.^{[9][40]} O formazano é um composto colorado cujo pico máximo de absorção é aos 490 nm.^[40]

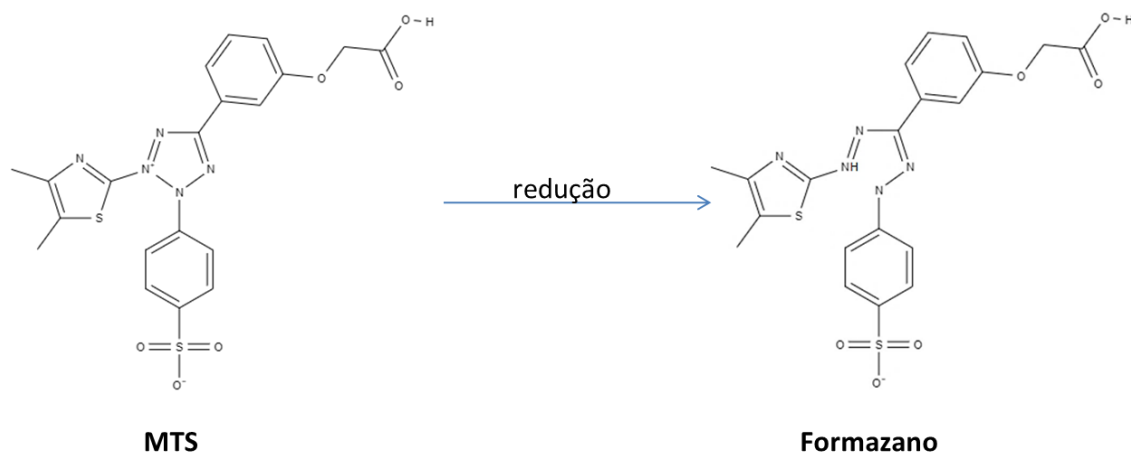


Figura 6. Esquema representativo da redução do MTS em Formazano. As moléculas foram desenhadas no MolView e o esquema foi baseado no artigo referenciado em [40].

1.3. Objetivo

Com base na necessidade de fluoróforos estáveis físico-quimicamente, com grande intensidade de luminescência e com efeitos citotóxicos reduzidos torna-se adequado o estudo das sodalites e nano-sodalites luminescentes como possíveis marcadores para microscopia de fluorescência. As sodalites são aluminossilicatos cristalinos não porosos que apresentam maior estabilidade estrutural que o seu precursor, o zeólito LTA-4A, e tem capacidade de encapsular determinados *clusters*.^{[11-13][18][20]} Os *clusters* de calcogenetos do tipo X_2^- apresentam propriedades luminescentes específicas.^{[12][18][19][20][25]} Ao serem encapsulados pelas sodalites estes radicais ficam protegidos do exterior e como tal mantêm o seu estado de oxidação e as suas propriedades fotoquímicas. Da combinação entre sodalites e os calcogenetos (X_2^-) resultam materiais com valores de Eficiência Quântica Externa e desvios de Stokes elevados.^{[12][18][19][20][25]} O desvio de Stokes consiste na diferença de energia, em cm^{-1} ou eV, entre o pico máximo de absorção e o pico máximo de emissão.^[40] Devido às propriedades referidas

anteriormente estes materiais são propícios para aplicações em microscopia de fluorescência. [2-9][11-14][32-35][38]

De todas as técnicas de microscopia de fluorescência conhecidas a que apresenta maior resolução é a microscopia confocal. [27] Esta técnica utiliza um laser de excitação de 480 nm, que é focado num ponto específico da amostra. Devido aos elevados tempos de exposição e à aplicação do laser num só ponto é possível obter imagens com maior resolução e em 3D. [27] Uma vez que o comprimento de excitação do *cluster* de selénio Se_2^- é de cerca 470 nm este calcogeneto é o mais oportuno para aplicação em microscopia confocal. Em termos de comprimento de onde emissão, o *cluster* de selénio apresenta uma emissão na gama do vermelho, por volta dos 750 nm. [20]

Tendo em conta as propriedades fotoquímicas e estruturais destes materiais, este projeto teve como objetivo avaliar a aplicabilidade das sodalites (e as nano-sodalites) de selénio luminescentes em microscopia de fluorescência, em sistemas biológicos. Para tal este estudo consistiu na síntese e caracterização de sodalites e nano-sodalites luminescentes, tendo o *cluster* de selénio Se_2^- como espécie emissiva, e a determinação da citotoxicidade e da viabilidade destes materiais para microscopia de fluorescência, em células animais.

2. Materiais e Métodos

A síntese e caracterização química das sodalites e nano-sodalites foi realizada nos laboratórios do grupo de Fotoquímica, em parceria com o grupo da VICARTE (Vidro Cerâmica para as Artes), e a solubilização das sodalites, bem como todos os ensaios biológicos foram realizados nos laboratórios de investigação dos grupos de Human Genetics and Cancer Therapeutics@FCT e de Nano medicina@FCT, da FCT-UNL.

De forma a alcançar o objetivo referido anteriormente, este projeto subdividiu-se em três fases:

- 1) Síntese, funcionalização e caracterização de sodalites de selénio
- 2) Síntese, funcionalização e caracterização de nano-sodalites de selénio
- 3) Estudo do efeito das sodalites e nano-sodalites sintetizadas em células humanas.

2.1. Síntese de sodalites e nano-sodalites de selénio

As sodalites de selénio foram obtidas por adaptação do procedimento de síntese de sodalites fotocromicas. [11] Previamente o zeólito Na –LTA (69836 *Sigma-Aldrich*) foi seco a 500 °C durante 5 horas (E-6, Barracha). Após a secagem do zeólito adicionou-se o NaCl (99,9%) (381659.1211 *Panreac*) e o Na_2SeO_3 (99%) (214485 *Sigma*). Para cada 3 moles de zeólito seco adicionou-se 2-x moles de NaCl e x moles de Na_2SeO_3 , com a finalidade de produzir sodalites com a estequiometria de $\text{Na}_8[\text{SiAlO}_4]_6\text{Se}_x\text{Cl}_{2-x}$, em que $x=0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0$ e $1,2$. Homogeneizou-se a mistura num moinho de bolas (PM 100C, Retsch) e

num agitador de pós (TURBULA T2F, Eskens). Cada um dos processos decorreu durante 90 minutos.

Seguidamente sinterizou-se a mistura obtida. Para tal, colocou-se o pó numa barquinha de alumina e levou-se a 900 °C, durante 1 hora, num forno elétrico tubular horizontal (TH1300, Termolab). Esta reação ocorreu sob atmosfera redutora de 5% de H₂/95% de Ar (v/v) a 500 mL/min. Aos 850 °C a fonte de atmosfera redutora foi removida. A sodalite luminescente foi retirada aos 550 °C e arrefecida à temperatura ambiente. As sodalites obtidas foram armazenadas em frascos de vidro, num exsiccador e protegidas da luz.

A síntese das nano-sodalites foi idêntica ao descrito anteriormente, com exceção de que apenas foi utilizada a estequiometria de Na₈[SiAlO₄]₆Se_{0,1}Cl_{1,9} (x=0,1).

2.2. Caraterização das sodalites

Após a síntese das sodalites e nano-sodalites prosseguiu-se para a caraterização das mesmas. A caraterização dos materiais sintetizados foi realizada recorrendo à técnica de Difração de Raios-X (DRX), Fluorescência de Raios-X (FRX), por microscopia de luz polarizada, à espectroscopia de reflectância difusa e à espectroscopia de fluorescência. [2][4][11][42-45]

2.2.1. Difração de Raios-X

Os espectros de Difração de Raios-X das sodalites foram obtidos pelo grupo de análises da REQUIMTE, no Departamento de Química da FCT-UNL. Os espectros foram obtidos no difractor de raio-X RIGAKU (modelo MiniFlex II) com tubo de raios-X de cobre (30 KV/15 mA), de 10° a 70° e com espaçamento de 2°/min.

2.2.2. Fluorescência de Raios-X

Os espectros de Fluorescência de Raios-X foram obtidos num espectrofotómetro portátil ArtTAX EDXRF (Röntec/Bruker), com lente policapilar de resolução espacial de 70 µm. Os espectros foram adquiridos nas seguintes condições: tensão 40 kV, intensidade 600 µA e tempo vivo 360 s.

2.2.3. Microscopia de Luz Polarizada

Para determinar as dimensões das partículas de sodalite, utilizou-se a técnica de microscopia de luz polarizada.^[42] As amostras foram fixadas em lamelas com a resina Cargille Meltmount* 1,680 (153-1680, McCRONE), cujo índice de refração é 1,68. A resina foi ligeiramente aquecida e colocou-se uma gota de resina na lâmina e, sobre essa gota, colocou-se um pouco de sodalite. Para remover o excesso de sodalite inverteu-se a lâmina e deu-se pancadas suaves. Por fim, aqueceu-se ligeiramente a lâmina, para amolecer a resina, e selou-se a sodalite, pela compressão da lamela sobre a resina. As imagens de microscopia foram obtidas com o microscópio Zeiss Axioplan 2 Imaging com câmara digital alta resolução

integrada. A objetiva utilizada foi de 50x e as imagens obtidas foram analisadas com o programa ImageJ, versão 1.50i.

2.2.4. Espectroscopia de Reflectância Difusa

Para determinar os espectros de reflectância difusa utilizou-se o espectrofotômetro Shimadzu UV-2501PC com o sulfato de bário como referência e *slits* de 2 nm. Os espectros foram obtidos de 200 a 800 nm e pela aplicação da teoria de Kubelka-Munk (KM) foi possível determinar os espectros de absorção das sodalites e nano-sodalites.^{[44][45]} (**Equação 2.1**).

Equação 2.1 $KM = \frac{((1-RD)/100)^2}{2 \times \left(\frac{RD}{100}\right)}$, em que RD são os valores da reflectância da sodalite.

2.2.5. Espectroscopia de Fluorescência

2.2.5.1. Espectros 3D e Espectros de Fluorescência da sodalite

Para a obtenção dos espectros de fluorescência das sodalites e nano-sodalites utilizou-se o espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon fluorolog FL3-22. Os espectros 3D foram obtidos com *slits* de 2,6 nm e para uma gama de excitação de 250 a 600 nm e uma gama de emissão de 550 a 900 nm. Os espectros de fluorescência foram obtidos no intervalo de 550 a 900nm, para comprimento de onda de excitação de 475 nm, e *slits* de 4 nm.

2.2.5.2. Eficiência Quântica Externa

Para determinar a Eficiência Quântica Externa^[21] da amostra os espectros de fluorescência foram obtidos no espectrofluorímetro referido anteriormente acoplado à esfera integradora (Labsphere, diâmetro de 100 mm). Utilizaram-se dois filtros: um filtro de densidade ótica (OD) e um filtro *cut-off*. O filtro de OD atenua a intensidade de luz captada pelo detector. Uma vez que o filtro utilizado foi o OD 2, apenas 20% da radiação emitida pela sodalite foi captada pelo detector. Por outro lado o filtro *cut-off* impede a passagem de toda a radiação cujo comprimento de onda é inferior ao comprimento de onda do filtro. Para estas sodalites utilizou-se o *cut-off* de 515 nm e assim toda a radiação com comprimentos de onda inferior a 515 nm foi impedida de chegar ao detector. As amostras foram excitadas a 475 nm e os espectros obtidos com o filtro *cut-off* foram adquiridos na gama de 550 a 900 nm. Para os espectros obtidos com o filtro OD 2, a sodalite foi excitada aos 475 nm, mas a gama de emissão obtida foi dos 465 aos 485 nm. Por cada filtro obteve-se os espectros sem amostra, num ângulo de 90° com detector, e com amostra, num ângulo de 90° (*in beam*) e de 45° (*out beam*) com o detector. Utilizaram-se as *slits* de 3 nm.

2.3. Funcionalização das sodalites

As sodalites de selênio sintetizadas foram funcionalizadas com o silano (3-Aminopropil)triétoxissilano (≥99,5%)(440140 Aldrich). Esta reação ocorreu a 110 °C, sob atmosfera de azoto e agitação vigorosa. Como solvente da reação utilizou-se tolueno (≥99,5%)

(LC261704) desidratado com *molecular sieve* 3 Å (M6141 Sigma). Este procedimento foi otimizado de forma a determinar qual o melhor tempo para a funcionalização das sodalites. As nano-sodalites foram funcionalizadas pelo procedimento referido anteriormente, mas tendo em conta o tempo de reação otimizado. Depois de funcionalizadas, as sodalites foram lavadas com tolueno ($\geq 99,5\%$) (LC261704) e diclorometano ($\geq 99,5\%$) (270997 Sigma-Aldrich). Por fim, as sodalites obtidas foram filtradas (funil de porosidade 3, DURAN® filter funnel) e secas em atmosfera de azoto.

2.4. Caraterização das sodalites funcionalizadas

Após a funcionalização das sodalites estas foram caracterizadas por análise elementar, de forma a determinar a presença de azoto (N), carbono (C) e hidrogénio (H). Para além disso, as sodalites funcionalizadas foram caracterizadas espectroscopicamente por espectroscopia de reflectância difusa e de fluorescência e pela determinação da Eficiência Quântica Externa.

2.4.1. Análise Elementar

As percentagens de N, H e C nas amostras de sodalite foram quantificadas pela Doutora Carla Rodrigues, do grupo de análises do REQUIMTE. O aparelho utilizado foi o Analisador Elementar Thermo Finnigan-CE Instruments Flash EA 1112 CHNS series.

2.4.2. Caraterização Espectroscópica

Os espectros de reflectância difusa das sodalites e nano-sodalites funcionalizadas foram obtidos de acordo com o capítulo 2.2.4 e os espectros de fluorescência foram obtidos de acordo com o ponto 2.2.5.1. A Eficiência Quântica Externa foi determinada de acordo com o capítulo 2.2.5.2.

2.5. Esterilização e Solubilização das Sodalites e Nano-sodalites

Para a realização de todos os ensaios biológicos as sodalites sintetizadas, funcionalizadas e não funcionalizadas, foram esterilizadas a seco ^[46], no forno (E-6, Barracha) a 100 °C, durante 2 horas. O forno utilizado pertence ao grupo da VICARTE, da FCT.

As sodalites foram solubilizadas em água, PBS (Phosphate Buffered Saline) e DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) previamente esterilizados. Estas soluções foram pré-aquecidas a 55 °C durante 40 min e, para cada 3 mg de composto, adicionou-se 2 mL de solvente. As dispersões foram homogeneizadas por vortex durante 30 segundos e deixadas repousar durante 20 minutos, a 55 °C. Após esta incubação decantou-se as dispersões e secou-se a fração depositada. Pela subtração da massa de sodalite depositada à massa de sodalite inicial, em solução, determinou-se a concentração da sodalite dispersa em cada solução.

2.6. Ensaios Biológicos

Após a solubilização dos compostos em estudo, iniciaram-se os estudos biológicos em células humanas. Para avaliar a citotoxicidade da sodalite e nano-sodalite em células humanas para aplicações futuras utilizou-se a cultura de fibroblastos da derme, obtidos pelo ATCC (*American Type Culture Collection*). Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo e como tal estão presentes em praticamente todas as partes do corpo humano.^[47] Dependendo da sua localização e atividade os fibroblastos apresentam uma morfologia específica e heterogénica. A sua principal função é manter a integridade do tecido conjuntivo através da produção de proteínas da matriz extra celular, como colagénios e glicoproteínas.^[47] Para além disso, os fibroblastos também desempenham um papel importante na cicatrização de feridas, sendo assim importante para o sistema imunitário.^[47] Por ter todas estas características os fibroblastos são a cultura celular não tumoral de eleição para estudos *in vitro*, sendo por isso utilizada no estudo desenvolvido nesta investigação.

2.6.1. Crescimento e Manutenção da Linhagem Celular

O crescimento e a manutenção da linhagem celular foram realizados pela Doutora Catarina Rodrigues. A linha celular em estudo foi cultivada em frascos de 75 cm² (SPL Life Sciences), com o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Invitrogen) suplementado com 10 % (v/v) de Soro Fetal de Bovino (FBS; Invitrogen) e 1 % (v/v) de antibiótico/antimicótico Penicilina – Estreptomicina (Pen-Step+Antimycotic; Invitrogen). Ao meio de cultura resultante da suplementação do DMEM com FBS e Pen denomina-se de meio completo. Os frascos de cultura foram incubados a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, numa estufa de CO₂ (Leec, Nottingham).

Para assegurar a continuidade do crescimento da linhagem celular é necessário proceder à sua manutenção, semanalmente. Quando atingirem uma confluência de cerca de 80 % (observada por microscópio invertido Olympus CXX41), significa que é altura de renovar a linhagem celular. Para isso remove-se o meio de crescimento celular e adiciona-se o TE (*TrypleTM Express*) (Invitrogen). Desta forma as ligações entre as células e o frasco de crescimento são cortadas. Após 5 minutos de incubação, centrifugou-se (centrifuga Hettich EBA21) a solução de TE com as células durante 5 minutos a 1500 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 1mL de meio completo.

Em seguida contou-se o número de células pelo método de exclusão por azul de *Trypan* (Sigma). Este processo consiste na penetração do *Trypan* nas células com integridade membranar corrompida e na contagem das células não coradas, com o auxílio de um hemocítmetro (Hirschmann). Assim preparou-se uma solução contendo 350 µL de meio completo, 100 µL de azul Trypan a 0,2% (v/v) e 50 µL da suspensão celular referida no parágrafo anterior. Esta solução foi observada ao microscópio ótico e as células foram contadas com o hemocítmetro. A densidade celular final (células/mL) foi obtida pela multiplicação do número total de células contadas, o volume da câmara do hemocítmetro (10⁴

mL⁻¹) e o fator de diluição (10) a dividir pelo número de quadrantes utilizados na contagem, estando representado na seguinte **equação 2.2**:

Equação 2.2
$$\text{N}^\circ \text{ de células/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células totais contadas} \times 10 \times 10^4}{\text{N}^\circ \text{ de quadrantes}}$$

Desta forma, determinou-se o volume de suspensão celular necessário para adicionar a um novo frasco de cultura. No final, as células foram incubadas a 37°C, a 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa.

2.6.2. Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi um passo determinante para avaliar o efeito da sodalite e nano-sodalite em ambiente celular. Para a realização de todos os ensaios biológicos utilizou-se uma densidade celular de 0,75 x 10⁵ células/mL, determinada pelo método descrito em 2.6.1. Desta solução, pipetou-se 100 µL para cada poço de uma placa de 96 poços de fundo plano (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica). A placa resultante foi incubada durante 24 horas a 37 °C, numa atmosfera com 5% (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa.

Ao fim das 24 horas foi adicionado o composto e respetivos controlos à cultura celular. As soluções com composto utilizadas foram as resultantes da diluição das soluções obtidas no capítulo 2.5 e, como controlo deste ensaio, utilizou-se o meio completo, sem sodalite. Para assegurar a qualidade da cultura celular utilizou-se doxorrubicina, cuja viabilidade em fibroblastos já se encontra conhecida (±80%).^[48] Uma vez que a mesma se encontra solubilizada em DMSO (Dimetilsulfóxido), foi realizado um controlo só com o DMSO.

Assim sendo, após a preparação de todas as soluções, aspirou-se o meio de cultura de cada poço e pipetaram-se 100 µL de cada solução para o respetivo poço. Além destas adições aos poços com células, também se pipetou 100 µL das soluções com o composto em estudo para poços sem material celular. Em seguida incubou-se a placa a 37 °C, 5% (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, durante 48 horas.

Ao fim de 48 horas aspirou-se todo o volume de solução dos poços com fibroblastos e adicionou-se 100 µL de uma solução de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) com DMEM suplementado, numa proporção de 20 µL de MTS para 80 µL de meio de cultura, para cada poço.

De forma a averiguar a existência de interação entre o composto em estudo e o MTS transferiu-se 80 µL de cada poço com composto sem células para o poço vazio abaixo. Assim, adicionou-se 80 µL da solução de MTS com meio de cultura aos poços onde a solução do composto esteve a incubar e 20 µL de MTS puro aos poços para onde se transferiu os 80 µL da solução com composto.

A placa foi incubada durante 45 min a 37 °C, 5% (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Após este tempo de incubação mediu-se a absorvância a 490 nm no leitor de microplacas *Multiskan FC Microplate Photometer* (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), e determinou-se a viabilidade celular por aplicação da **equação 2.3**:

Equação 2.3 Viabilidade Celular (%) = $\frac{\text{Abs 490nm (amostra)}}{\text{Abs 490 nm (controle)}} \times 100$

Para assegurar a sua reprodutibilidade o ensaio foi realizado em triplicado para cada composto à respetiva concentração (replicados técnicos) e também em semanas diferentes, (replicados biológicos).

2.6.3. Avaliação da internalização da sodalite e nano-sodalite

A verificação da internalização do composto em estudo foi realizada por espectroscopia de fluorescência. Para estes ensaios utilizaram-se placas de 24 poços de fundo plano (VWR) e pipetaram-se 500 µL da solução de fibroblastos com densidade de $0,75 \times 10^5$ células / mL, para cada um dos poços necessários ao ensaio. As placas foram incubadas durante 24 horas, como no ponto anterior. Ao fim das 24 horas foi adicionado a solução de sodalite ou nano-sodalite, a determinada concentração, assim como o respetivo controlo, ou seja, células com o meio de cultura sem o composto em estudo. Após a introdução do estímulo nos fibroblastos, a respetiva placa voltou a ser incubada a 37 °C, 5% (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, durante 48 horas.

Ao fim das 48 horas de incubação dos fibroblastos com e sem composto removeu-se o meio de crescimento de cada poço e guardou-se em eppendorfs. Aos poços foram adicionados 300 µL de TE e aguardou-se 5 min. Essas soluções foram centrifugadas durante 5 min a 700 G. Com a separação da fração celular do resto da solução, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se os fibroblastos em DMEM suplementado. Os espectros de emissão foram obtidos como explicado no ponto 2.2.5.1 e com *slits* de 10 nm.

2.6.4. Ensaio de Microscopia de Fluorescência

Para observar o comportamento da sodalite e nano-sodalite nos fibroblastos recorreu-se à microscopia de fluorescência. Neste ensaio foram utilizados dois microscópios: o microscópio de fluorescência invertido (Eclips Ti – E, Nikon) e o microscópio de fluorescência convencional (AxioImager D2 - Zeiss).

2.6.4.1. Microscópio Invertido

O microscópio invertido é um microscópio cuja fonte de luz e condensador estão na parte superior, enquanto as objetivas estão em baixo, apontando para cima. A grande vantagem deste microscópio, em relação ao convencional, é que permite a observação de células e organismos vivos sem preparação em lâmina.^[49]

Visto que este microscópio permite a aquisição de imagens diretamente da placa de crescimento celular, a aderência dos fibroblastos nas placas de 24 poços foi igual ao referido anteriormente (capítulo 2.6.3). Assim, ao fim das 24 horas, adicionou-se a solução de sodalite às células, assim como o respetivo controlo (células apenas com meio completo). Após a

introdução do estímulo nos fibroblastos, a respetiva placa voltou a ser incubada a 37 °C, 5% (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, durante 6, 22 ou 48 horas, de acordo com o desejado.

Concluído o tempo de incubação retirou-se o meio de cultura dos respetivos poços, lavou-se duas vezes com 300 µL de PBS 1x e adicionou-se 100 µL de solução de marcação de Hoechst 33258 (Fenol,4-[5-(4-metil-1-piperazinil)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-il] -, trihidroclorido 23491-45-4) . O Hoechst 33258 é uma sonda fluorescente com grande afinidade para ácidos nucleicos e, quando ligado ao DNA, tem como comprimentos de onda de emissão e excitação de 461 e 352 nm, respetivamente.^{[35][38]} Após incubação de 15 minutos, retirou-se a solução de marcação e lavou-se novamente duas vezes com 300 µL de PBS, deixando o PBS da última lavagem em cada poço.

As imagens de microscopia foram obtidas com a objetiva de 40x, no campo de luz clara, e na região do UV (gama de excitação 340- 380 nm), para obter imagem dos núcleos marcados com Hoechst 33258 e na região do verde (gama de excitação 510- 560 nm), para observar a fluorescência das sodalites. As imagens foram corrigidas e analisadas com programa ImageJ.

2.6.4.2. Microscópio de Fluorescência Convencional

Para adquirir imagens de microscopia num microscópio não invertido é necessário fixar as células num sistema lamina-lamela. Antes de cultivar as células, as lamelas (VWR) foram esterilizadas por imersão em etanol 70% (v/v). As lamelas foram colocadas na placa de 24 poços (VWR), deixou-se evaporar o etanol e lavou-se com PBS 1x. Seguidamente, deixou-se os fibroblastos aderirem às lamelas durante 24 horas a 37 °C, 5% (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Após este período, o meio de cultura foi substituído pelas soluções de sodalite e nano-sodalite, bem como meio novo (controles). Depois de introduzir a sodalite nas células, a placa voltou a ser incubada a 37 °C, 5% (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, durante o tempo desejado (6, 22 ou 48 horas).

Após o tempo de incubação, o meio foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x. Na ausência de luz, adicionou-se 100 µL de uma solução de Hoechst 33258 (5 µg/mL), a cada poço, e aguardou-se 15 minutos. Em seguida, lavou-se três vezes com PBS 1x e adicionou-se 200 µL de paraformaldeído 4% (v/v) (PFA; Invitrogen), para fixar as células à lamela. Após 20 minutos de incubação lavou-se três vezes com o PBS 1x, deixando-se o PBS da última lavagem no respetivo poço. Por fim, adicionou-se uma gota de glicerol no centro da lâmina, colocando cuidadosamente a lamela por cima e selou-se a preparação com verniz transparente.

As imagens de microscopia foram obtidas com a objetiva de 100x, no campo de luz clara, na região do UV (gama de excitação 335 – 383 nm) e na região do verde (gama de excitação 540 – 552 nm). As imagens foram corrigidas e analisadas com programa Zen 2.3 (*blue edition*).

3. Resultados e Discussão

3.1. Síntese das sodalites e nano-sodalites de selênio

As sodalites podem ser sintetizadas por três métodos diferentes: reações de condensação a baixas temperaturas, em soluções básicas; a elevadas temperaturas e por transformação estrutural.^{[1][11]} O método de síntese das sodalites é determinado pela estabilidade do catião a temperaturas elevadas e a soluções básicas.^[11] Como referido anteriormente, as sodalites foram sintetizadas pelo método sinterização em estado sólido.^[11] Este método é o mais indicado quando se pretende encapsular precursores aniônicos, como Cl^- e o Se^- , que tem dificuldade a aceder à gaiola β .^[11] Partindo do zeólito LTA-4A e pela variação da quantidade estequiométrica de NaCl e de Na_2SeO_3 foram sintetizadas dez sodalites diferentes ($\text{Na}_8[\text{SiAlO}_4]_6\text{Se}_x\text{Cl}_{2-x}$, com x entre 0,05 e 1,2). Na **Figura 7** encontram-se apresentadas as sodalites de selênio sintetizadas.

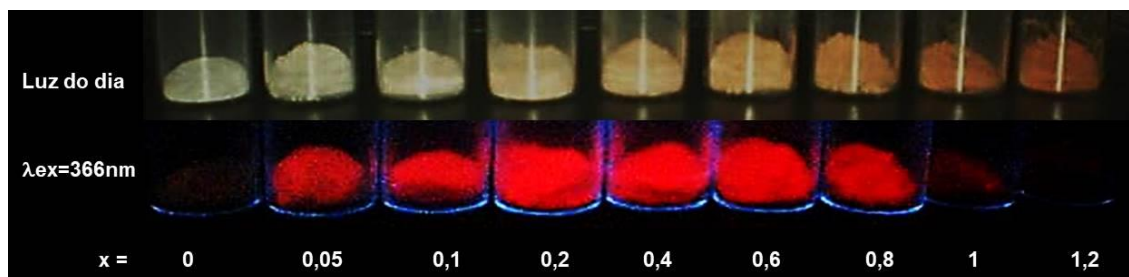


Figura 7. Comparação das propriedades fotoquímicas das sodalites de selênio sintetizadas. As imagens foram obtidas sob luz solar e luz UV (λ_{ex} :366 nm). Por baixo da figura estão indicados os valores de selênio presentes na composição da sodalite ($\text{Na}_8[\text{SiAlO}_4]_6\text{Se}_x\text{Cl}_{2-x}$).

As sodalites obtidas foram identificadas pelo coeficiente estequiométrico de selênio na constituição da sodalite ($\text{Na}_8[\text{SiAlO}_4]_6\text{Se}_x\text{Cl}_{2-x}$, em que $x=0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0$ e 1,2) e é assim que serão identificadas no resto da dissertação. Pela análise da **Figura 7** é possível observar a influência da quantidade estequiométrica de selênio na cor e na luminescência das sodalites sintetizadas. No caso da sodalite sem selênio ($x=0$) a sodalite obtida apresentava cor branca e não manifestou fluorescência. Quando o selênio foi introduzido na síntese das sodalites, a partir de x de 0,05, as sodalites desenvolveram alteração de cor e verificou-se o efeito de luminescência. Para $x=0,05$ a cor observada foi rosa claro e a luminescência manifestada foi vermelha. Com o aumento da quantidade de selênio presente na síntese da sodalite, a sua cor intensificou-se até cor-de-laranja escuro, para $x=1,2$.^{[12][19][20][25]} Relativamente à luminescência, as sodalites selênio ($x>0$) apresentaram luminescência vermelha quando expostas à uma fonte de luz UV de 366 nm (**Figura 7**). A intensidade de luminescência observada nas sodalites foi diminuindo com o aumento da quantidade de selênio na amostra, sendo quase inexistente para $x\geq 1$.

Tendo em conta as alterações espectroscópicas entre $x=0$ e $x>0$ (**Figura 7**) foi possível verificar que a presença de selénio na síntese das sodalites influencia as propriedades espectroscópicas das sodalites. Apesar do *clusters* de Se_2^- ser o *cluster* mais plausível de causar este efeito de luminescências nas sodalites sintetizadas, ^{[12][19][20][25]} foi necessário realizar uma caracterização espectroscópica das amostras para verificar esta possibilidade. A diminuição da luminescência observada para as sodalites com $x \geq 1$ (**Figura 7**) pode estar relacionada com a formação de um outro *cluster* no interior da sodalite. Com outra espécie de selénio presente na sodalite outras propriedades fotoquímicas podem ser alteradas. Este tipo de alterações já foi observado para *clusters* de enxofre encapsulados em sodalites. ^{[12][19][20][25]}

3.2. Caracterização das sodalites sintetizadas

A caracterização dos zeólitos engloba a determinação da sua estrutura, pureza e dimensão da partícula do zeólito, bem como das suas propriedades espectroscópicas. ^{[2][4][11][42-45]} Todas estas características são específicas de cada zeólitos e determinam as suas aplicações. As técnicas mais utilizadas na caracterização estrutural e elementar dos aluminossilicatos são a Difração de Raios-X (DRX) e a Fluorescência de Raios-X (FRX). Pela combinação destas duas técnicas é possível obter uma caracterização completa da estrutura e pureza do material sintetizado. ^{[2][4][43]}

3.2.1. Difração de Raios-X

A Difração de Raios-X (DRX) baseia-se na capacidade de um material difratar a radiação de raios-X incidente. ^{[26][43]} Cada zeólito possui uma organização tridimensional definida, logo o padrão de Difração de Raios-X produzido pela estrutura é característico desse tipo de zeólito. ^{[2][4][43]} Desta forma, pela comparação dos padrões de Difração de Raios-X produzidos é possível verificar se o composto sintetizado é realmente o desejado ou se está contaminado com algum subproduto da síntese. ^[11]

Na síntese sólida da sodalite, a partir do zeólitos LTA-4A a estrutura contaminante mais provável é a nefelina ($\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$). ^{[11][15][16]} Apesar de ser constituído pelos mesmo elementos que o zeólito LTA, a nefelina apresenta uma organização hexagonal que a impede de captar iões de cloro. ^{[11][15][16]} O encapsulamento do selénio na estrutura da sodalite resulta da permuta iónica entre os iões de selénio exteriores e os iões de cloro encapsulados nas gaiolas β . ^[12] Desta forma, a incapacidade da nefelina encapsular os iões de cloro na sua estrutura trespassa-se para os iões de selénio. ^{[15][16]} Na **Figura 8** estão identificados os picos característicos da sodalite e da nefelina para todos os espectros das sodalites de selénio sintetizadas.

Ao comparar os espectros de DRX da sodalite e da nefelina (**Figura 1 em Anexo**) com os espectros das amostras sintetizadas foi possível identificar seis picos específicos da nefelina e quatro picos específicos da sodalite (**Figura 8**). Apesar de todas sodalites obtidas

apresentarem alguma contaminação, os picos de maior intensidade são os de sodalite. Desta forma foi possível inferir que o produto obtido é maioritariamente composto por sodalite.

Relativamente aos picos de nefelina identificados, verificou-se que a sua presença e intensidade aumentavam com o aumento da quantidade de selénio introduzida na síntese das sodalites (**Figura 8**). Para sodalites com $x \leq 0,4$ a contaminação por nefelina era reduzida, a partir desse valor verificou-se o aumento deste contaminante. Com base nestas observações foi possível concluir que a presença de selénio contribui para formação da nefelina.

Pela comparação entre a **Figura 7** e a **Figura 8** foi possível relacionar o aumento da presença de nefelina com a diminuição da luminescência das sodalites. Tanto a presença de nefelina como a diminuição da luminescência são dependentes do aumento da presença de selénio na síntese da sodalite.^{[15][16]} A nefelina não exibe luminescência, desta forma se uma amostra apresenta maior contaminação de nefelina a sua luminescência é reduzida. Desta forma outra justificação para o decréscimo da intensidade de luminescência das sodalites, com $x \geq 1$ é a influência da contaminação da amostra por nefelina.

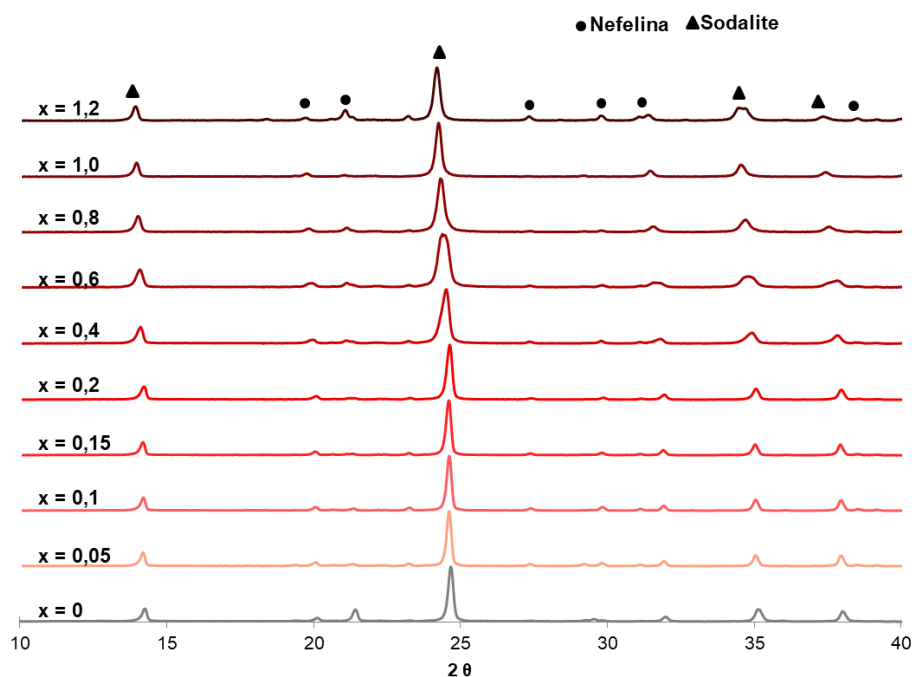


Figura 8. Espectros de DRX das sodalites de selénio sintetizadas. Cada sodalite é identificada pela quantidade estequiométrica de selénio na sodalite (valor de x). Os picos marcados com triângulos são característicos do espectro da sodalite enquanto os círculos indicam os picos característicos do espectro da nefelina.

3.2.2. Fluorescência de Raios-X

A Fluorescência de Raios-X (FRX) é uma técnica de análise elementar indicada para materiais líquidos e sólidos.^{[26][43]} A técnica de FRX consiste na irradiação da amostra com raios-X e na deteção dos raios-X emitidos sob a forma de fluorescência. Uma vez que cada elemento possui os seus eletrões distribuídos em orbitais específicas, a radiação incidente

interage com os elementos de forma diferente. ^{[26][43]} Assim é possível obter o sinal específico de cada elemento.

Esta técnica permite a determinação dos constituintes elementares da sodalite, como o alumínio, o cloro, o selênio, o silício e o sódio, e avaliação da evolução da presença desses constituintes para as diferentes sodalites sintetizadas. ^{[2][11][15][16][27][43]} Na **Figura 9** encontram-se apresentados três espectros de FRX de três sodalites diferentes: sem selênio ($x=0$), com selênio e elevada intensidade de luminescência ($x=0,2$) e com selênio e sem luminescência visível ($x=1,2$), de forma a serem representativos de todas as amostras sintetizadas.

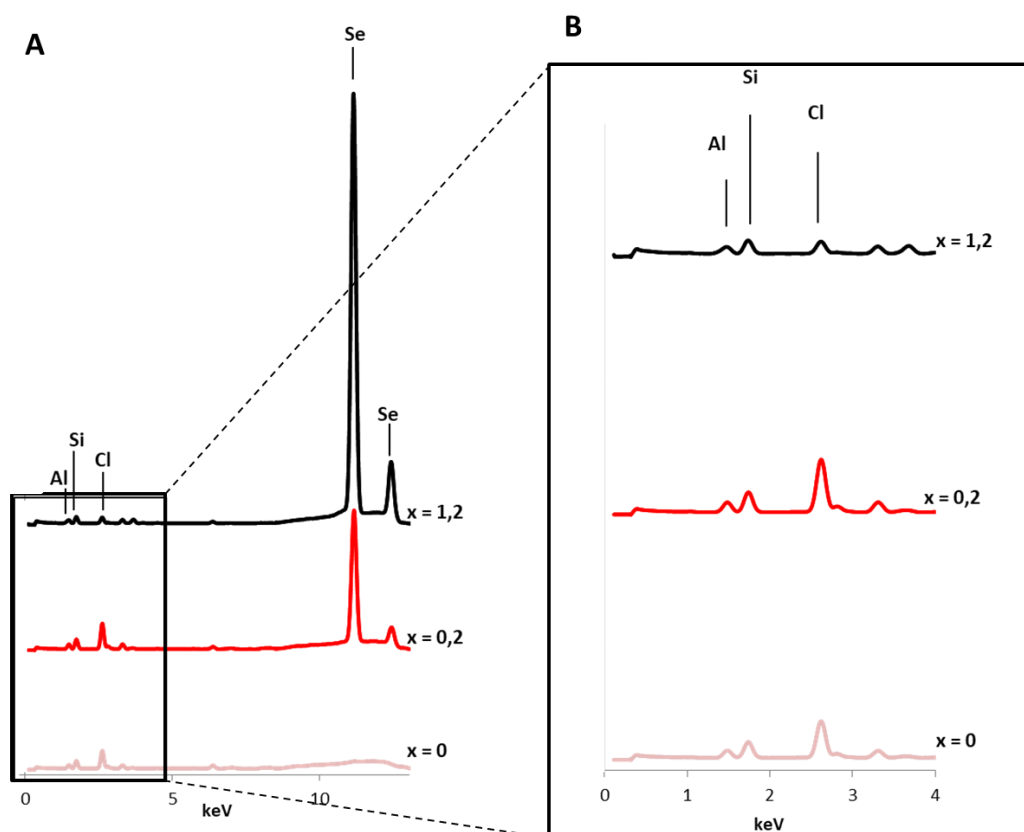


Figura 9. Espectros de FRX das sodalites sintetizadas. Na **Figura 9 A** estão apresentados três espectros de FRX correspondentes à sodalite sem selênio ($x=0$) e com selênio ($x=0,2$ e $1,2$) e na **Figura 9 B** encontram-se focados os picos referentes aos átomos de alumínio (Al), cloro (Cl) e silício (Si). Os espectros foram tratados no programa Artax.

Pela análise dos espectros de FRX, apresentados na **Figura 9**, foi possível identificar cinco picos característicos da sodalite: um de alumínio (1,5 keV), um de silício (1,7 keV), um de cloro (2,6 keV) e dois de selênio (11,2 e 12,5 keV). Contudo o pico característico do sódio (1,0 keV) não foi observado em nenhum dos espectros obtidos. Para a sodalite sem selênio ($x=0$) os picos de selênio não foram observados, o que nos permitiu confirmar que a sodalite de $x=0$ não apresentava qualquer contaminação de selênio. Comparando os três espectros apresentados, foi possível verificar alterações na intensidade dos picos do Se e do Cl. Estas variações refletem o encapsulamento nas sodalites sintetizadas e representam a permuta de iões de

cloro por íons de selênio. Para uma melhor interpretação das variações observadas na **Figura 9**, determinou-se os rácios das intensidades dos picos de Al/Si, Cl/Si e Se/Cl. A variação dos rácios determinados em função da sodalite de selênio sintetizada encontra-se apresentada na **Figura 10**.

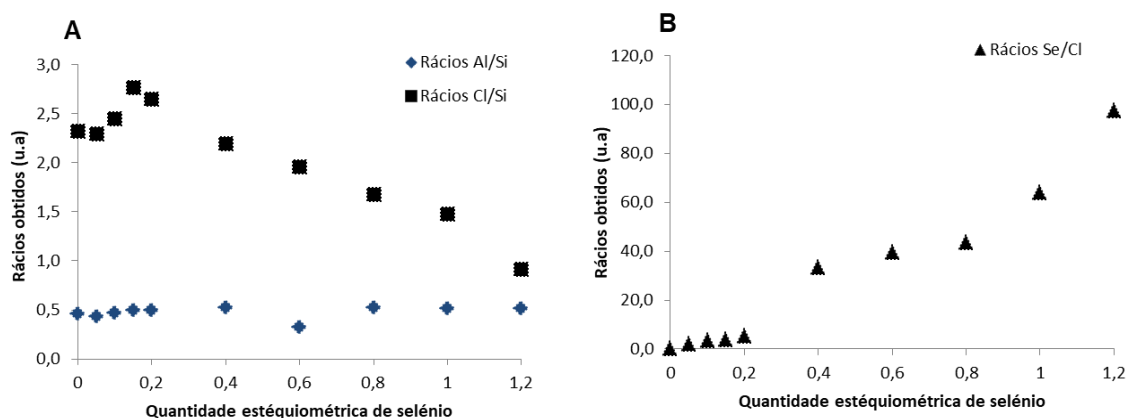


Figura 10. Representação gráfica da evolução dos rácios resultantes da análise dos espectros de FRX em função da quantidade estequiométrica de selênio na sodalite. Na **Figura 10 A** são apresentados os rácios Al/Si e Cl/Si e na **Figura 10 B** está representado o rácio Se/Cl de todas as sodalites sintetizadas.

Na **Figura 10 A** estão apresentados os rácios de Al/Si e de Cl/Si de todas as sodalites sintetizadas. O rácio Al/Si é característico do tipo de zeólito e determina a sua estrutura.^{[2][4][43]} Para todas sodalites sintetizadas o rácio obtido foi idêntico e constante (aproximadamente 0,5). Esta estabilidade do rácio Al/Si deve-se às condições de síntese da sodalite.^{[2][4][43]} Visto que não houve adição de nenhuma fonte externa de alumínio ou silício durante a síntese e o zeólito foi o mesmo para a síntese de todas as sodalites, era espectável que o rácio Al/Si não apresentasse alterações. Pelo rácio Cl/Si (**Figura 10 A**) foi possível observar a diminuição da presença de cloro com o aumento da concentração de selênio na síntese da sodalite (valor de x). Esta diminuição tinha sido observada na **Figura 9** e está relacionada com a estequiometria da síntese de sodalite. Nesta síntese, como o cloro e o selênio ficam encapsulados nas gaiolas β da sodalite, quando se aumentou a quantidade de selênio, na síntese, reduziu-se a quantidade de cloro. Na **Figura 10 B** encontra-se apresentado o rácio Se/Cl. Pela análise deste rácio foi possível verificar o aumento do encapsulamento do selênio na sodalite, como observado na **Figura 9**. O encapsulamento do selênio ocorre pela troca iónica com os íons de cloro e é gradual,^[12] como observado na **Figura 10 B**.

Após a caracterização estrutural e elementar das sodalites sintetizadas, passou-se a sua caracterização espectroscópica. Essa caracterização consistiu na análise dos espectros de absorção e de fluorescência e na determinação da Eficiência Quântica Externa e do brilho das sodalites sintetizadas.

3.2.3. Espectroscopia de Reflectância Difusa

A cor de um material resulta da interação dos seus constituintes com a luz.^[49] A forma de caracterizar essa propriedade fotoquímica em materiais sólidos é por espectroscopia de reflectância difusa.^{[45][46]} Esta espectroscopia baseia-se na capacidade de reflexão de uma amostra. Pela aplicação do teorema de Kubelka-Munk (**Equação 2.1**) é possível converter os espectros de reflectância difusa em espectros de absorção.^{[45][46]}

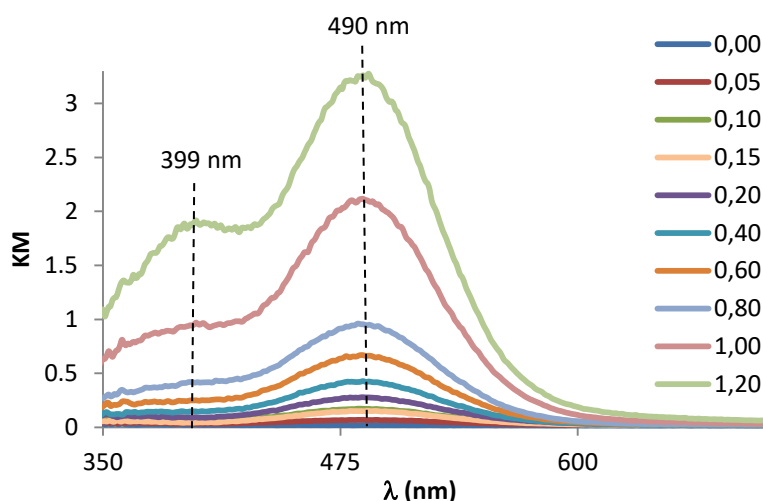


Figura 11. Espectro de absorção das sodalites sintetizadas, obtido pela aplicação da lei de Kubelka –Munk.

Na **Figura 11** estão apresentados os espectros de Kubelka-Munk obtidos para todas as sodalites sintetizadas. Pela análise dos espectros obtidos observou-se dois picos de absorção, um pico de maior intensidade aos 490 nm e outro, menos intenso, aos 399 nm. Este resultado está de acordo com o observado na **Figura 7**. O pico obtido aos 399 nm é menos intenso que o pico obtido aos 490 nm pelo que não influencia a cor da sodalite. Este pico torna-se mais evidente para as sodalites com $x \geq 1$.

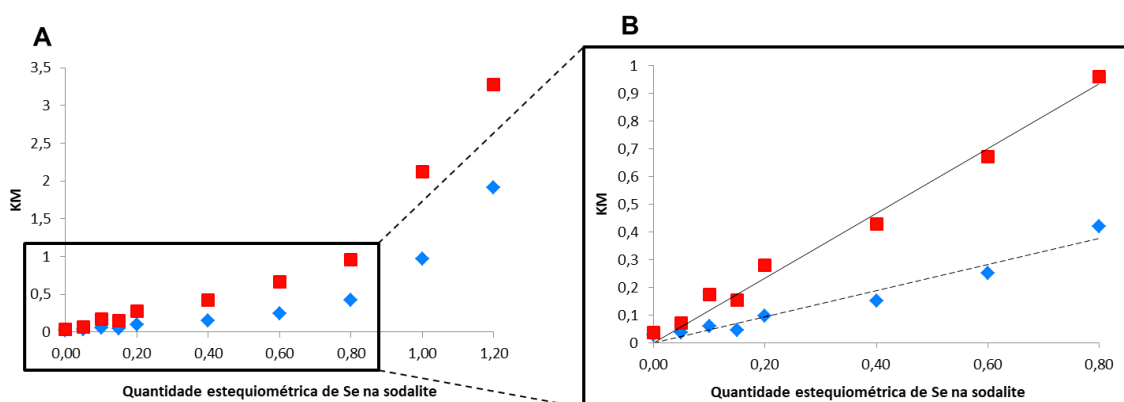


Figura 12. Variação da intensidade dos picos de absorção em função da quantidade estequiométrica de selênio de cada sodalite: (A) para todas as sodalites sintetizadas e (B) para as sodalites com luminescência observada na Figura 7. Os quadrados vermelhos são referentes ao pico de absorção observado aos 490 nm e os losangos azuis são referentes ao pico de absorção obtido aos 399 nm. Na figura (B) estão representadas as regressões lineares dos pontos apresentados: linha

contínua ($y=1,1671x$; $R^2=0,986$) representa os pontos obtidos para o pico de absorção aos 490 nm e a reta a tracejado ($y=0,4697x$; $R^2=0,9541$) representa os pontos obtidos para o pico de absorção aos 399 nm.

Na **Figura 12 A** está representada a variação das intensidades de absorção para todas as sodalites sintetizadas. Na **Figura 12 B** está representada a variação das intensidades de absorção para as sodalites cuja luminescência foi observada na **Figura 7**. Pela análise destas figuras foi possível verificar que o aumento da intensidade dos picos de absorção está diretamente relacionado com a quantidade de selénio presente na sodalite. Este aumento de intensidade de absorção em função da quantidade de selénio vem justificar a intensificação da cor laranja para sodalites com quantidade de selénio elevadas, observada na **Figura 7**. Pela comparação entre a figura **12 A** e **12 B**, verificou-se que as sodalites com valores de $x \leq 0,8$ apresentam um aumento da intensidade de absorção mais acentuado comparativamente às sodalites com para $x \geq 1$. Esta diferença pode dever-se tanto à presença de nefelina, observada para valores de x elevados ($x \geq 1$), como à formação de outra espécie de *cluster* encapsulado na sodalite. Com o aumento da presença de nefelina há menos selénio encapsulado logo menor intensidade de cor. ^{[14][16]} Por outro lado, como o *cluster* determina as propriedades fotoquímicas das sodalites, a alteração deste afeta as propriedades, como a cor da sodalite. ^{[12][18][20][25][49]}

3.2.4. Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência permite determinar as propriedades luminescentes de um determinado composto. ^{[12][20][24][25]} Esta espectroscopia baseia-se na capacidade que determinados compostos, como o *cluster* Se_2^- , têm de fluorescer. Uma espécie excitada com determinada gama de energia e liberta parte dessa energia sobre a forma de fluorescência. ^{[12][20][24][25]} No caso da espécie Se_2^- este *cluster* é um duplete cuja fluorescência deve-se da transição permitida $\pi \rightarrow \pi^*$. ^{[12][19][20]} Para o estudo das propriedades luminescentes das sodalites determinou-se os espectros 3D, os espectros de fluorescência e os valores de Eficiência Quântica Externa para cada uma das sodalites sintetizadas.

3.2.4.1. Espectros 3D

Os espectros 3D são espectros de emissão obtidos pela excitação de uma amostra numa gama específica de comprimentos de onda. Desta forma, foi possível traçar o perfil de excitação-emissão das sodalites sintetizadas. As sodalites foram excitadas na gama dos 280 aos 600 nm e a sua emissão foi obtida dos 550 aos 900 nm. Desta forma foi possível definir o comprimento de onda de excitação das sodalites para o qual a intensidade de luminescência fosse máxima. Na **Figura 13** são apresentados dois espectros 3D, respetivos à sodalite sintetizada com $x=0,1$ (**Figura 13 A**) e $x=1,2$ (**Figura 13 B**) de selénio.

Pela análise da **Figura 13 A** ($x=0,1$) foi possível determinar que o comprimento de onda de excitação para o qual se obtém maiores intensidades de fluorescência encontra-se entre 475 e 500 nm (zona do azul e verde). Para estes comprimentos de onda de excitação, o

máximo de emissão encontra-se centrado aos 750 nm (zona do vermelho). Esta gama de excitação e emissão são característicos do *cluster* de Se_2^- .^{[19][20]} Contudo, para concentrações elevadas de selénio ($x=1,2$) (**Figura 13 B**) a gama de excitação e de emissão máxima sofrem um deslocamento, comparativamente a $x=0,1$. A emissão máxima dos 750 nm para os 850 nm (zona do infravermelho) e a gama de excitação encontra-se ente os 400 e os 350 nm (zona do ultravioleta) (**Figura 13 B**). Uma vez que o olho humano não tem capacidade para detetar a radiação na gama do infravermelho, quando a fluorescência da sodalite passa para esta gama (**Figura 13 B**) esta deixa de ser visível, como observado na **Figura 7**. Estes resultados vão de encontro com a hipótese da formação de um novo *cluster* durante a síntese da sodalite e descartam a hipótese da perda de luminescência por influência da nefelina.^{[12][14][16][18][20][25]} Durante a síntese das sodalites com excesso de selénio é possível ocorrer a dimerização da espécie Se_2^- . Apesar de ser uma hipótese plausível, a dimerização deste *cluster* nas gaiolas β das sodalites ainda está a ser investigada.

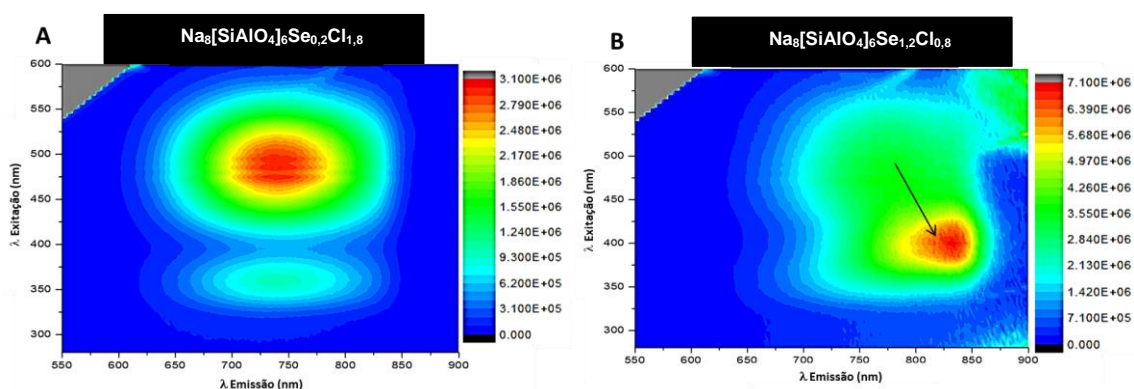


Figura 13. Espectros 3D das sodalites $x=0,2$ (A) e $x=1,2$ (B) sintetizadas. As sodalites foram excitadas na gama de 280 a 600 nm e a sua emissão foi obtida de 550 a 900 nm. As *slits* utilizadas foram de 2,6 nm.

3.2.4.2. Espectroscopia de Fluorescência, Eficiência Quântica Externa e Brilho

Após a determinação do comprimento de excitação ideal para obter o máximo de intensidade de luminescência, traçou-se os espectros de fluorescência para todas as sodalites sintetizadas e avaliou-se o comportamento da fluorescência em função da quantidade estequiométrica de selénio na sodalite (**Figura 14**).

Na **Figura 14 (A)** estão apresentados todos os espectros de fluorescência das sodalites sintetizadas, quando excitadas a 475 nm. Pela análise destes espectros foi possível identificar um pico de máxima emissão aos 740 nm e comprovar, numericamente, que o aumento da quantidade de selénio na síntese da sodalite diminui a intensidade de fluorescência da mesma. Pela análise da **Figura 14 B** foi possível avaliar da influência da quantidade estequiométrica de selénio na intensidade de luminescência da sodalite. Desta forma, observou-se o aumento da intensidade de luminescência da sodalite até $x= 0,1$. A partir desse ponto a intensidade de luminescência diminui linearmente com o aumento da quantidade de selénio presente na

sodalite. Com base nos resultados expostos na **Figura 14** foi possível selecionar as sodalites mais propícias para aplicação em microscopia de fluorescência (x entre 0,05 e 0,4).

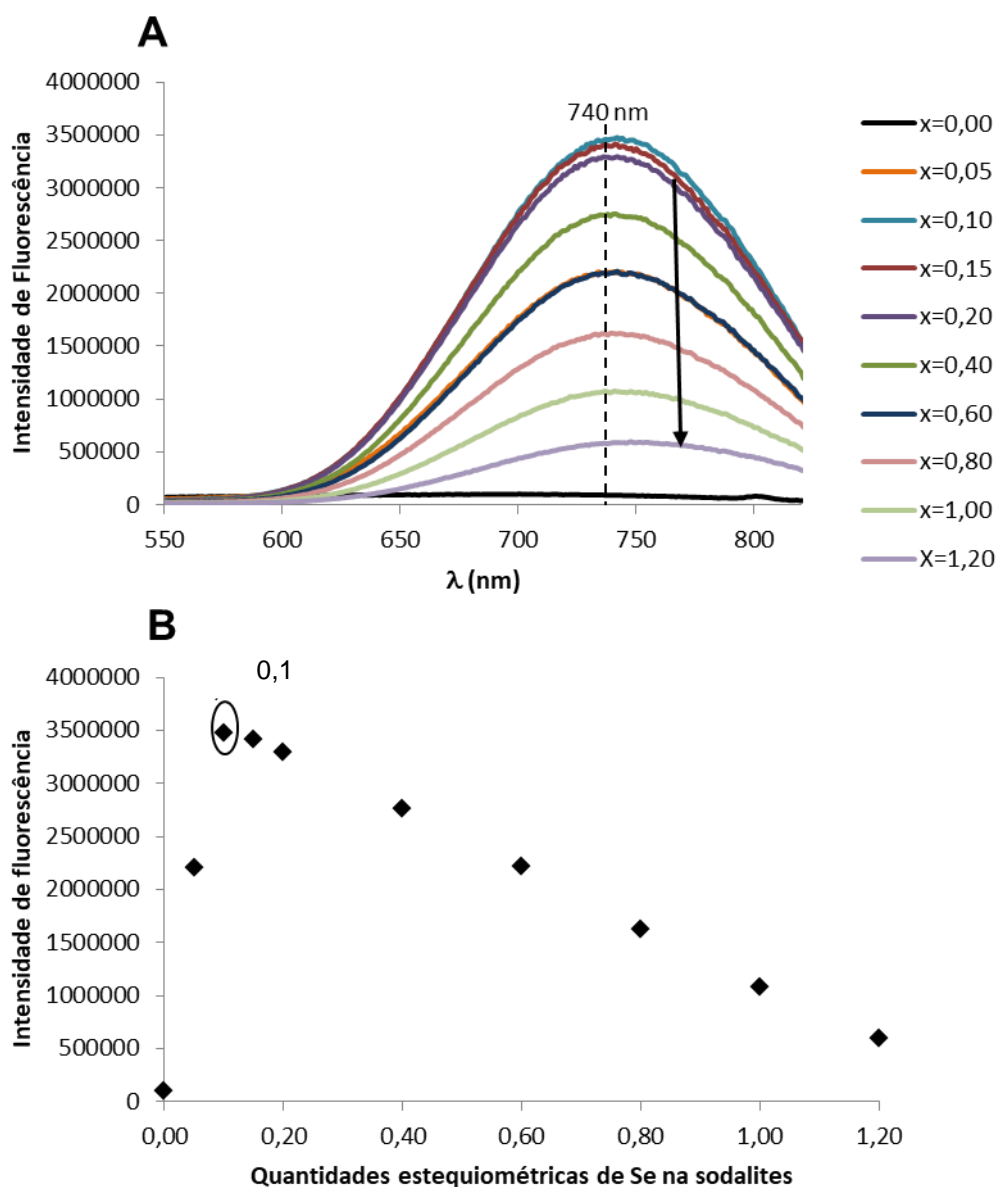


Figura 14. Comportamento da luminescência das sodalites. Na **Figura 14 A** estão apresentados os espectros de emissão das diferentes sodalites sintetizadas. As sodalites foram excitadas a 475 nm e a sua emissão foi obtida entre 550 e 820 nm. Na **Figura 14 B** está representada a relação entre a quantidade de selênio presente na sodalite e a intensidade de fluorescência máxima obtida para cada uma das sodalites. O círculo em torno do ponto 0,1 serve para salientar que este é valor de x cujo pico de fluorescência apresenta maior intensidade.

Contudo, para definir concretamente qual a sodalite com melhores propriedades luminescentes para microscopia de fluorescência foi necessário determinar a Eficiência Quântica Externa^[21] e o brilho da sodalite. A Eficiência Quântica Externa de um material é definida como a proporção do número de fótons emitidos em relação à quantidade de fótons absorvidos.^[21] O brilho de um material luminescente é definido pela intensidade da luz que é

observada num composto fluorescente. Recorrendo à **Equação 3.1**, determinou-se os valores do brilho para as diferentes sodalites, ao comprimento de onda de 475 nm.

Equação 3.1. $Brilho = EQE (\%) * (100 - RD)$

em que RD corresponde ao valor de reflectância difusa máximo

Os valores de EQE e de brilho das sodalites encontram-se relacionados com a quantidade estequiométrica de selénio nas sodalites sintetizadas. Essa relação encontra-se apresentada na **Figura 15**.

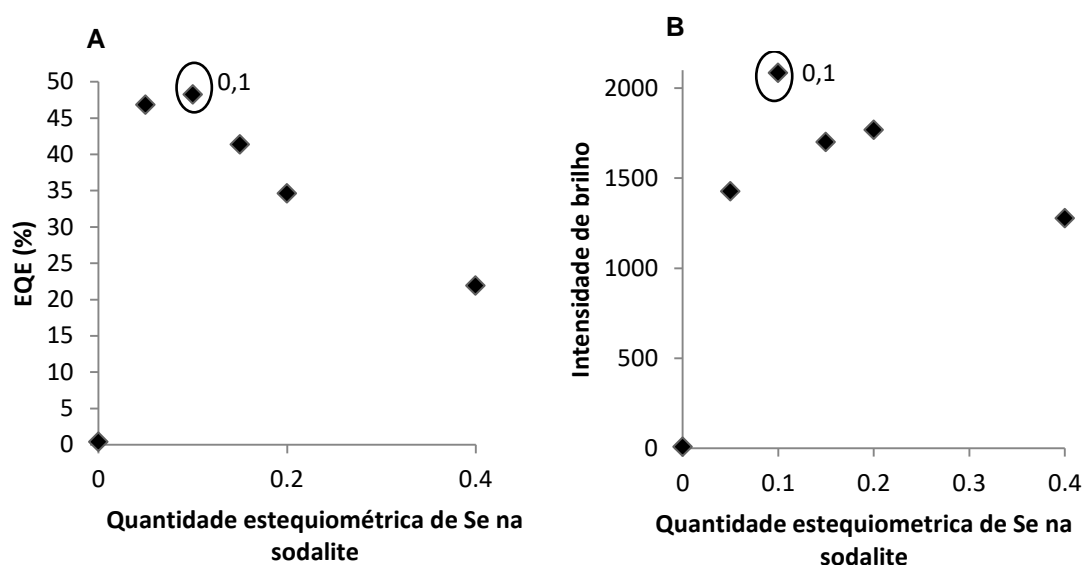


Figura 15. Relação entre Eficiência Quântica Externa (A) e o brilho (B) com as quantidades estequiométricas de selénio nas sodalites sintetizadas. Os valores de EQE foram obtidos para o λ excitação de 475 nm. O círculo em torno do ponto 0,01 serve para salientar que este é valor de x cujos valores de EQE e o brilho são máximos.

Pela análise da **Figura 15 A** foi possível observar a variação da Eficiência Quântica Externa das diferentes sodalites e a sua relação com a quantidade de selénio na amostra. Esta variação apresenta um padrão semelhante ao observado na **Figura 14 B**, o que confirma que a EQE está diretamente relacionada com a intensidade de luminescência. O valor máximo de EQE foi obtido para a sodalite $x=0,1$ foi de 48%. A partir deste valor de x, verifica-se a diminuição dos valores de EQE para as restantes sodalites (22%, para $x=0,2$). A variação da intensidade do brilho em função da quantidade de selénio presente na sodalite encontra-se apresentada na **Figura 15 B** e apresenta o mesmo perfil de comportamento observado para o EQE e para o máximo de fluorescência em função de x. O valor máximo de brilho foi de 2085, para $x=0,1$. Tendo em conta os resultados de espectroscopia de fluorescência, de EQE e de brilho foi possível concluir que a sodalite $x=0,1$ é a sodalite com maior luminescência e a mais indicada para aplicação em microscopia de fluorescência.

3.2.5. Dimensões das partículas da sodalite

As dimensões das partículas são essenciais para determinar internalização celular destes compostos. ^{[4][8][10][17][43][44]} Existem várias técnicas com elevada resolução que permitem determinar as dimensões das sodalites, como o SEM (scanning electron microscope, ou microscopia eletrónica de varrimento) e o TEM (Transmission electron microscopy, ou microscopia de transmissão eletrónica). ^{[4][8][10][17][43]} Por uma questão de disponibilidade de aparelho recorreu-se à técnica de microscopia de luz polarizada, para determinar as dimensões das sodalites sintetizadas. A microscopia de luz polarizada é uma das técnicas utilizadas para determinar o tamanho e morfologia das partículas de zeólitos. ^[44] A imagem de contraste resulta da interação da luz polarizada com uma amostra duplamente refratária. Desta interação resultam duas componentes de onda polarizadas perpendiculares, a onda comum e a onda extraordinária. ^[44] Quando passam pelo detetor as ondas são recombinadas, com interferência construtiva ou destrutiva. Como esta técnica baseia-se na capacidade do material difratar a luz polarizada incidente é necessário utilizar amostras ou materiais com índices de refração diferentes. ^{[2][43][44]} Na **Figura 16** encontra-se apresentada a imagem obtida por microscopia de luz polarizada da amostra de sodalite, sob a objetiva de 50x, (A) e o gráfico de distribuição das partículas em função das suas dimensões, em μm^2 (B).

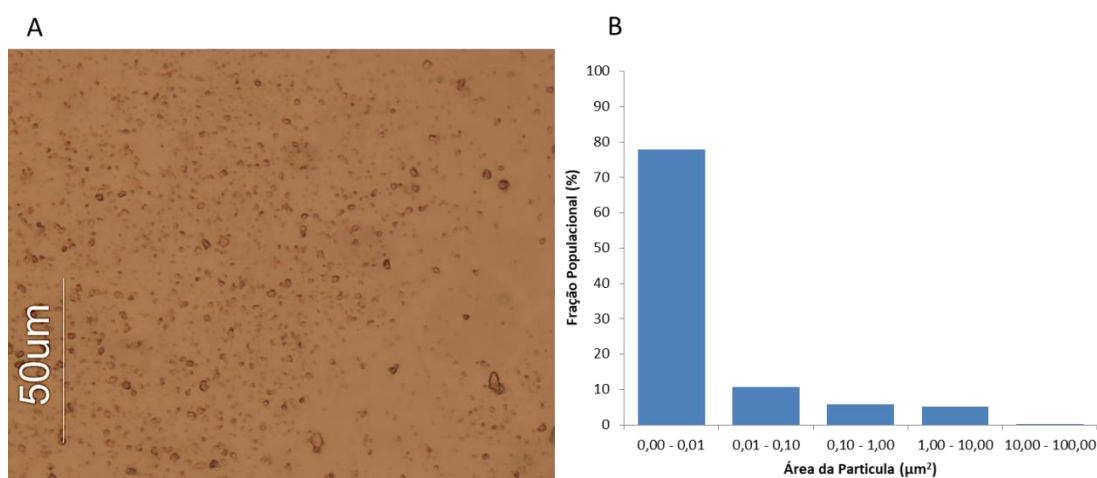


Figura 16. Dimensões das partículas da sodalite. A imagem das partículas da sodalite (A) foi obtida por microscopia de luz polarizada, com objetiva de 50x. A distribuição das partículas pelas suas dimensões (B) foi obtida recorrendo à análise pelo programa ImageJ.

Pela análise da **Figura 16 A** foi possível verificar que as dimensões das partículas de sodalite não são uniformes. Esta variação pode estar relacionada com a possível agregação das sodalites durante a síntese, levando à formação de pequenos aglomerados. Para determinar as dimensões médias dessas partículas, recorreu-se ao programa ImageJ. Essa quantificação de distribuição encontra-se apresentada na **Figura 16 B**. Pela análise desta distribuição foi possível verificar que cerca de 78% das partículas identificadas pelo programa estão abaixo do limite de deteção do aparelho. Cerca de 11% das partículas detetadas apresentam dimensões entre 0,01 - 0,1 μm^2 ; 6% têm dimensões entre 0,1 - 1 μm^2 ; 5 % tem

dimensões entre 1 - 10 μm^2 e nenhuma partícula foi encontrada com mais de 10 μm^2 . As partículas identificadas não possuem dimensões propícias para internalização celular. Terminada a síntese e caracterização das sodalites iniciou-se a otimização da funcionalização das sodalites.

3.3. Funcionalização

A funcionalização é o processo que consiste no revestimento da superfície de um material por um determinado composto de forma a alterar as suas propriedades, como a solubilidade e a carga superficial. ^{[6][8][17][29][39]} De entre as várias moléculas utilizadas as mais comuns são o PEG (polietilenoglicol) e os silanos. ^{[6][17][29][39]} Devido ao grupo amina, que proporciona carga positiva à estrutura da sodalite, e aos três grupos etoxi o APTES é o silano mais utilizado na área biomédica. ^{[6][17][39]} Desta forma, a sodalite de selénio com maior luminescência ($x=0,1$) foi funcionalizada com o silano APTES e o tempo de reação utilizado foi de 1 e 3 horas. As sodalites obtidas foram nomeadas de acordo com o tempo de reação (**Tabela 2**).

Tabela 2. Nomenclatura das sodalites de selénio $x=0,1$ funcionalizadas com APTES.

Nomenclatura	Tempo de funcionalização (h)
F0	0
F1	1
F3	3

3.3.1. Caracterização das sodalites funcionalizadas

Após a funcionalização as sodalites obtidas foram caracterizadas por análise elementar, por espectroscopia de absorção e de fluorescência e pela determinação do EQE e do brilho.

3.3.1.1. Análise Elementar

A análise elementar de azoto, carbono e hidrogénio permite determinar a presença ou ausência desses elementos na composição da sodalite. Ao calcular o rácio azoto/carbono (N/C) é possível ter ideia da qualidade da reação de funcionalização. Sabendo que o APTES não reagido tem 9 carbonos para 1 azoto, então o seu rácio de N/C seria de 1:9. Numa silanização completa, todos os três grupos etoxi hidrolisam-se e apenas o resto do silano liga à sodalite, desta forma o rácio N/C seria de 1:3. Por isso quanto mais próximo de 1:3 for o rácio obtido melhor será a qualidade da funcionalização. ^[39] Os valores obtidos da análise elementar encontram-se na **Tabela 1**, em **Anexos**. Na **Figura 17** é possível observar a variação do rácio N/C em função do tempo de reação.

Pela análise da **Figura 17** foi possível verificar que para a sodalite não funcionalizada, uma vez que não apresenta carbono ou azoto na sua composição, o seu rácio de N/C é de 0. Contudo, logo após 1 hora de funcionalização o rácio de N/C aumenta para 0,17, indicando que a reação de silanização ocorreu. Para as sodalites funcionalizadas durante 3 horas o rácio N/C

é de 0,21. Com os resultados obtidos foi possível afirmar que ocorreu silanização da sodalite, contudo, tendo em conta que os rácios N/C obtidos para os diferentes tempos de silanização foram próximos, não foi possível garantir qual dos tempos de reação era o ideal para silanização completa da superfície da sodalite.

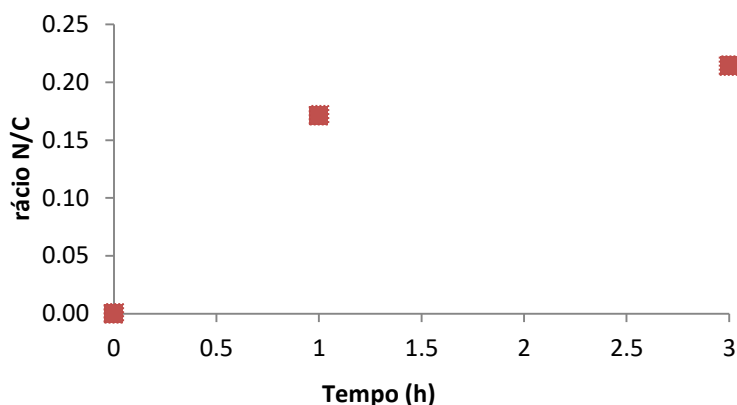


Figura 17. Evolução do rácio N/C em função do tempo de silanização

3.3.1.2. Caraterização Espectroscópica

Após a caraterização elementar das sodalites funcionalizadas analisou-se a influência do revestimento da sodalite pelo silano APTES sobre as suas propriedades espectroscópica. Desta forma, analisou-se os espectros de absorção e de fluorescência, bem como determinou-se a Eficiência Quântica Externa (EQE) e o brilho das sodalites funcionalizadas.

3.3.1.3. Espectroscopia Absorção e de Fluorescência

Como parte da caraterização espectroscópica da sodalite traçou-se os espectros de absorção da sodalite. Como referido anteriormente (capítulo 2.2.4), o espectro de absorção das sodalites foi obtido por aplicação da lei de Kubelka-Munk ^{[45][46]} nos espectros de reflectância difusa das sodalites funcionalizadas. A espectroscopia de fluorescência é crucial para a caraterização das propriedades fotoquímicas das sodalites luminescentes. Na **Figura 18** encontram-se apresentados os espectros de absorção **(A)** e de fluorescência **(B)** dos diferentes tempos de silanização para a sodalite $x=0,1$.

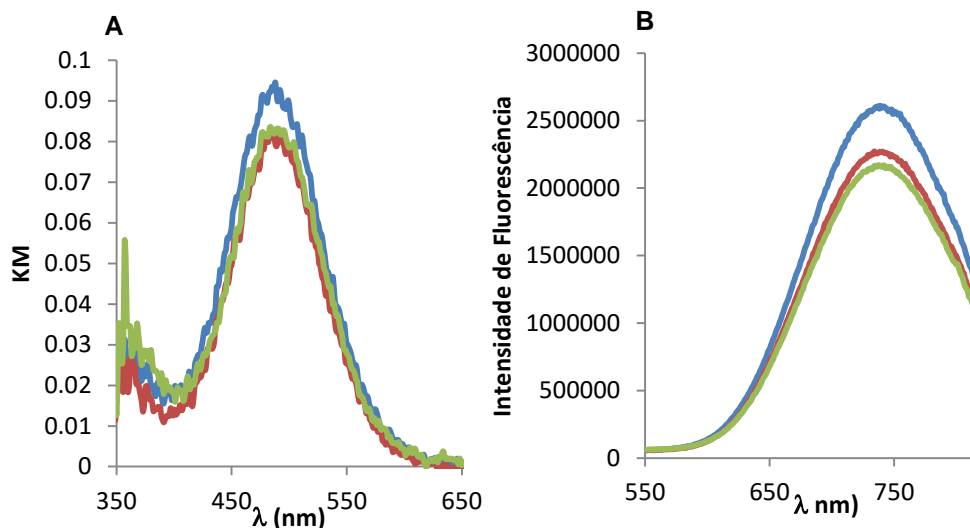


Figura 18. Espectros de absorção (A) e de fluorescência (B) das sodalites de selênio $x=0,1$, com diferentes tempos de funcionalização com APTES. As sodalites são definidas como F0, para a sodalite não funcionalizada (linha azul), F1 (linha vermelha) e F3 (linha verde), para sodalites funcionalizadas durante 1 e 3 horas. Os espectros de Kubelka-Munk foram obtidos com *slits* de 2 nm e os espectros de emissão foram obtidos de 550 a 820 nm, ao comprimento de excitação de 475 nm e com *slits* de 3 nm.

Pela análise da **Figura 18 (A e B)** foi possível verificar que o processo de silanização não alterou as propriedades espectroscópicas da sodalite sintetizada. O pico máximo de absorção continuou a surgir aos 490 nm e o pico de fluorescência máxima aos 740 nm.

3.3.1.4. Eficiência Quântica Externa e Brilho das sodalites

Para além da fluorescência foi também determinada a Eficiência Quântica Externa (EQE) e o brilho de todas as silanizações. Na **Figura 19 (A e B)** é possível observar a variação dos valores de EQE e do brilho em função dos diferentes tempos de silanização da sodalite.

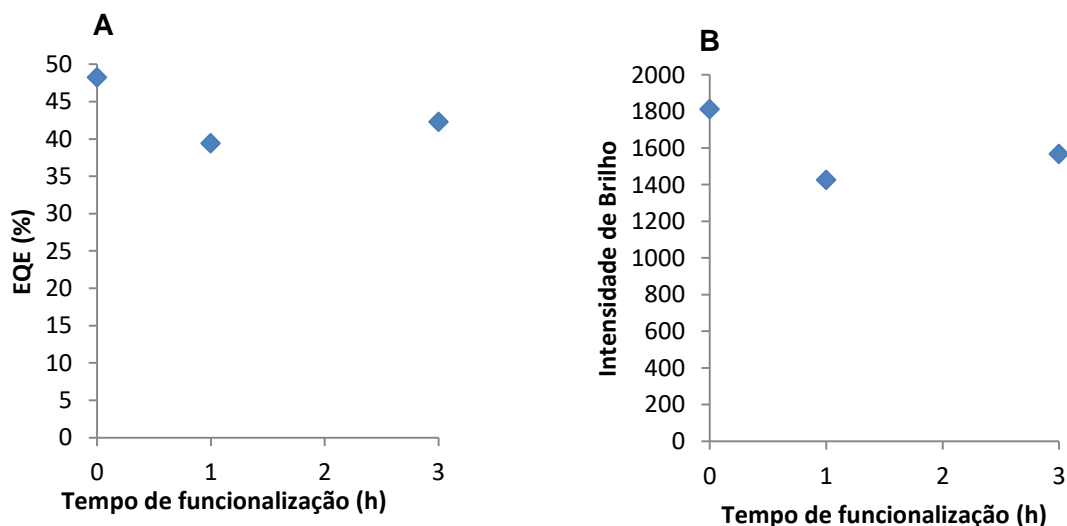


Figura 19. Variação da Eficiência Quântica Externa (A) e do brilho (B) da sodalite em função do tempo de silanização.

Pela análise da **Figura 19** foi possível verificar que a silanização também não afeta o EQE e o brilho das sodalites. Como as propriedades espectroscópicas do *cluster* não foram alteradas após a silanização, ambos os tempos de reação poderiam ser utilizados. Em termos de rácio N/C, a sodalite F3 obteve o rácio mais próximo do conhecido para reação completa (1:3).^[38] Por isso o tempo de funcionalização utilizado neste trabalho foi o de 3 horas.

3.3.1.5. Dimensões das partículas da sodalite funcionalizadas

Para finalizar a caracterização das sodalites funcionalizadas procedeu-se à determinação do seu tamanho médio. Visto que os resultados obtidos para as 3 horas de silanização (F3) foram os mais promissores, a determinação do diâmetro das partículas funcionalizadas foi apenas realizada para F3. Na **Figura 20** encontra-se apresentado o diagrama de distribuição da área das partículas (μm^2) em função da fração populacional observada, tanto para as sodalites não funcionalizadas (F0) como para as funcionalizadas (F3).

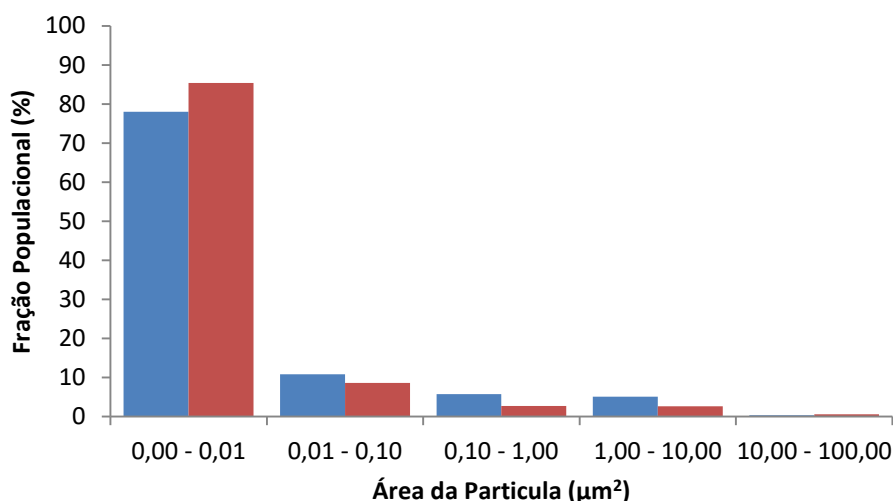


Figura 20. Relação entre as dimensões das partículas da sodalite não funcionalizada (F0, barras azuis) e funcionalizada (F3, barras vermelho). A distribuição das partículas pelas suas dimensões foi obtida recorrendo ao programa ImageJ.

Pela análise da **Figura 20**, foi possível verificar que a silanização apresenta alguma influência sobre a área da partícula de sodalite. A percentagem das partículas abaixo do limite de deteção aumentou (de 78%, em F0, para 85%, em F3) e para as restantes dimensões houve uma ligeira diminuição. Esta alteração pode dever-se ao facto de que a funcionalização facilita a dispersão das sodalites, evitando a formação de agregados.^{[8][17]} Desta forma as sodalites funcionalizadas têm mais facilidade de dispersar em solução e consequentemente são mais propícia a internalizar nos fibroblastos.

3.4. Síntese das Nano-Sodalite

As nano-sodalites são sodalites com dimensões de nanómetros. As nano-sodalites foram sintetizadas pelo método de síntese sólida, descrito no capítulo 2.1, a partir do nano-zeólitos

LTA-4A. Depois da otimização da síntese e funcionalização de sodalites de selênio luminescentes passou-se à síntese das nano-sodalites. A estequiometria utilizada foi $\text{Na}_{8,5}[\text{SiAlO}_4]_6\text{Se}_{0,1}\text{Cl}_{1,9}$ e o tempo de funcionalização foram 3 horas. Na **Figura 21** é possível observar a nano-sodalite sintetizada expostas à luz do dia e sobre radiação ultravioleta (366 nm).

Pela comparação entre a nano-sodalite e sodalite ($x=0,1$) (**Figura 21**) foi possível verificar que a nano-sodalite apresenta uma menor intensidade de luminescência comparativamente à sodalite. Existem duas hipóteses que podem explicar esta diferença: 1) elevada contaminação por nefelina ^{[15][16]} e 2) presença de outro *cluster* encapsulado na sodalite. ^{[12][19][20]} Ambas as hipóteses já foram desenvolvidas no capítulo 3.2 e por isso não vão ser explicadas aqui. Para determinar a razão da diferença observada na **Figura 21** procedeu-se à caracterização da estrutura da nano-sodalite, por DRX, e à caracterização espectroscópica do *cluster* encapsulado.

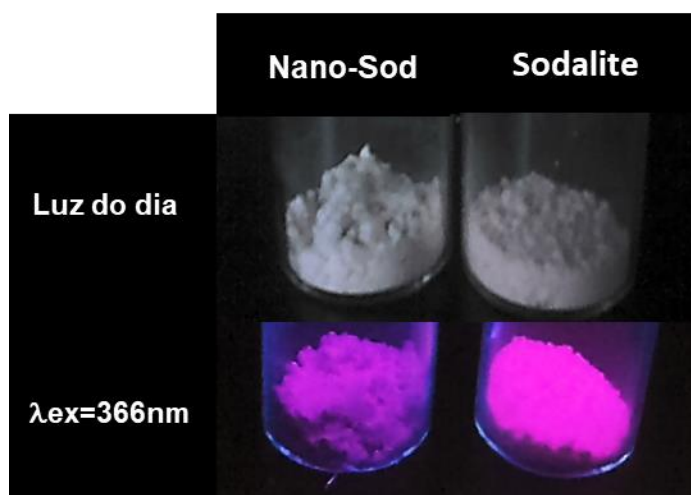


Figura 21. Nano-sodalite e Sodalite ($x=0,1$) não funcionalizadas, expostas à luz solar e à luz UV (λ excitação = 366 nm).

3.5. Caracterização das Nano-sodalites

As nano-sodalites obtidas, funcionalizadas (F3) e não funcionalizadas (F0) foram caracterizadas por análise elementar, por espectroscopia de reflectância difusa, por espectroscopia de fluorescência e pela determinação da Eficiência Quântica Externa e da intensidade de brilho. A caracterização estrutural das nano-sodalites foi realizada por Difração de Raios-X.

3.5.1. Difração de Raios-X

Na **Figura 22** encontra-se apresentado o espectro de DRX da nano-sodalite não funcionalizada.

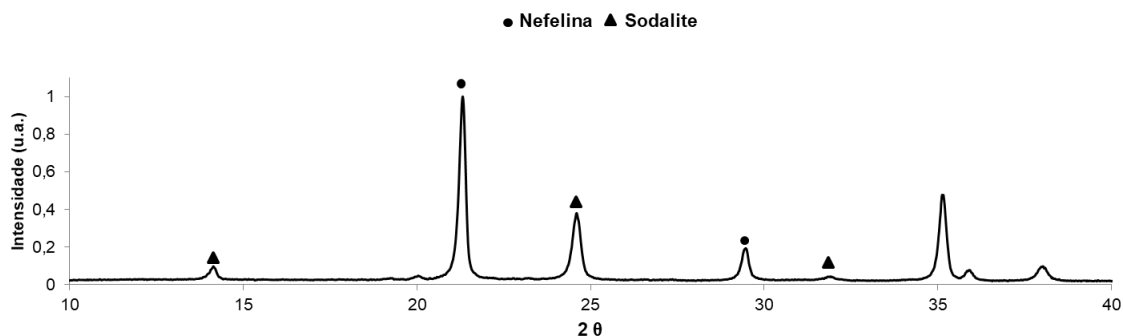


Figura 22. Espectro de DRX da nano-sodalite de selênio. Neste espectro estão assinalados os picos característicos da nefelina (círculo) e da sodalite (triângulo).

Na **Figura 22** foi possível identificar 9 picos, em que 6 destes picos são picos característicos da sodalite e 3 são característicos da nefelina (**Figura 1**, em **Anexo**). Como observado para as sodalites (**Figura 8**), as nano-sodalites também resulta uma mistura entre sodalite e nefelina. Contudo, no caso das nano-sodalites sintetizadas, o pico de maior intensidade é um dos picos de característicos da nefelina. Isto significa que a contaminação das nano-sodalites por nefelina é superior do que o observado nas sodalites de selênio sintetizadas. Tendo em conta que este subproduto pode formar-se antes ou depois da formação da sodalite é necessário realizar uma otimização do processo de síntese das sodalites e nano-sodalites. ^{[11][15]} A elevada presença de nefelina nas nano-sodalites sintetizadas pode ser o fator dominante responsável pela reduzida luminescência observada na **Figura 21**. ^{[15][16]}

3.5.2. Dimensões da Nano-sodalite

O diâmetro das nano-sodalites sintetizadas foi determinado por microscopia de luz polarizada. ^[44] Na **Figura 23** encontra-se apresentada a imagem obtida por microscópio de luz polarizada das nano-sodalites e a distribuição populacional das nano-sodalites analisadas em função das dimensões detetadas, com o programa ImageJ.

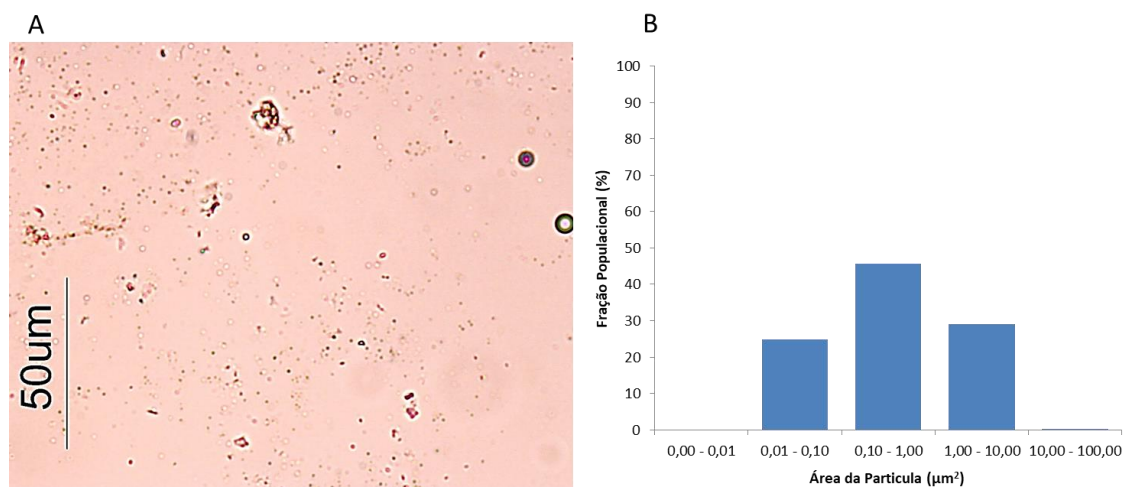


Figura 23. Dimensões das partículas das nano-sodalites sintetizadas. A imagem das partículas das nano-sodalites (**A**) foi obtida por microscopia de luz polarizada, com objetiva de 50x. A distribuição das partículas pelas suas dimensões (**B**) foi obtida recorrendo à análise pelo programa ImageJ.

Na **Figura 23 A** encontra-se apresentada a imagem das partículas das nano-sodalites não funcionalizadas observáveis por microscopia de luz polarizada e sob a objetiva de 50x. Pela análise da **Figura 23 A** no programa ImageJ foi possível obter a distribuição das partículas da sodalite pelas suas dimensões, em μm^2 . Esta distribuição encontra-se apresentada na **Figura 23 B**. Nenhuma partícula com dimensões inferiores ao limite de deteção foi identificada e a maioria das nano-sodalites (46%) apresentam dimensões entre os 0,1 e os 1 μm^2 . Contudo as dimensões das partículas das nano-sodalites não são uniformes. Esta variação pode estar relacionada com a possível agregação das nano-sodalites durante a síntese, levando à formação de pequenos aglomerados. Esta possibilidade já tinha sido mencionada na análise da **Figura 18**. Na **Figura 24** encontram-se relacionadas as áreas obtidas para as nano-sodalites funcionalizadas (F3) e não funcionalizadas (F0).

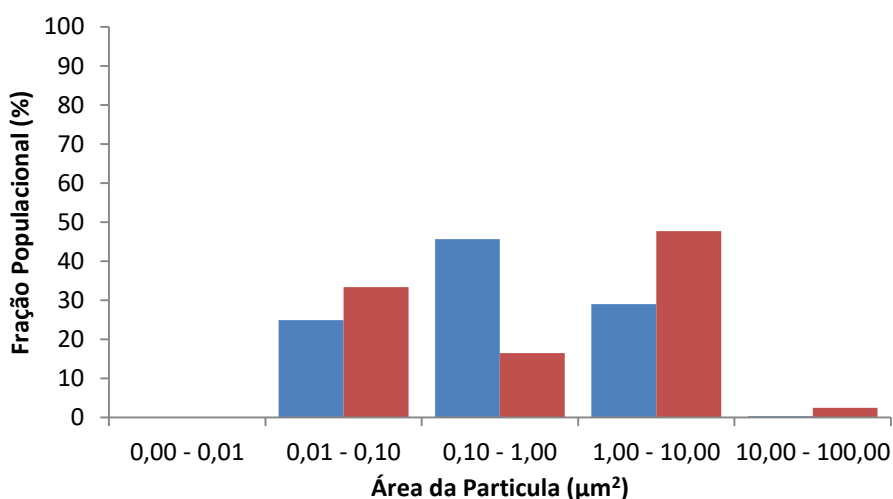


Figura 24. Relação entre a área das partículas das nano-sodalites não funcionalizada (F0) e funcionalizada (F3) e a fração populacional avaliada. A distribuição das partículas pelas suas dimensões foi obtida recorrendo à análise pelo programa ImageJ.

Pela observação da **Figura 24** foi possível verificar uma diminuição da fração populacional determinada para as partículas, de F3 (16 %) em relação a F0 (46 %), entre 0,1 e 1 μm^2 . Todos os outros intervalos de área determinados sofreram um aumento do número de partículas F3 em relação a F0. A variação observada na **Figura 24** pode dever-se à formação de policamadas de silano em torno das nano-sodalites.^[39] A formação de policamadas de silano em torno da superfície é um efeito comum em processos de silanização. Este fenómeno resulta do excesso de tempo de reação ou excesso de água nos reagentes. Tendo em conta que todos os reagentes foram desidratados com *molecular sieves*, a causa mais provável para a formação das policamadas é o tempo excessivo de funcionalização.^[38] As nano-sodalites têm uma área superficial inferior às sodalites. Desta forma, a quantidade de silano necessária para revestir a superfície das nano-sodalites será inferior à necessária para revestir as sodalites.

[6][8][17][39]

Uma otimização do procedimento de silanização teria de ser efetuada para ter um melhor resultado quanto às dimensões das partículas. Finalizada a análise estrutural e a determinação do diâmetro das nano-partículas iniciou-se a caracterização da funcionalização e, também a caracterização fotoquímica das nano-sodalites obtidas.

3.5.3. Análise Elementar

Como mencionado anteriormente, a análise elementar permite-nos verificar se a silanização ocorreu e se o silano está ligado completamente à sodalite. Na **Tabela 3** estão apresentados os rácios N/C obtidos para as nano-sodalites e para as sodalites. Pela **Tabela 3** é possível observar que tanto as nano-sodalites como as sodalites apresentam um rácio N/C de, aproximadamente, 1:3 (0,33). Estes valores indicam que a funcionalização das nano-sodalites ocorreu eficientemente, como observado para as sodalites de selénio (**Figura 19**), e não ocorreu a formação de policamadas de silano na superfície das nano-sodalites.^{[17][39]}

Tabela 3. Comparação entre os rácios N/C obtidos para as nano-sodalites e para as sodalites, funcionalizadas (F3) e não funcionalizadas (F0).

	Nano-sodalite	Sodalite
F0	0,0	0,0
F3	0,3	0,2

3.5.4. Caracterização Fotoquímica das nano-sodalites

As propriedades fotoquímicas das nano-sodalites sintetizadas, funcionalizadas e não funcionalizadas, foram avaliadas. Para tal obteve-se os espectros de absorção, os espectros de fluorescência e determinou-se a Eficiência Quântica Externa e o brilho das nano-sodalites sintetizadas.

3.5.4.1. Espectroscopia de absorção e de fluorescência

Os espectros de absorção e de fluorescência foram obtidos de acordo com o referido no capítulo 2.2.5. Na **Figura 25** estão apresentados os espectros de absorção (**A**) e de fluorescência (**B**) das nano-sodalites e sodalites com $x=0,1$.

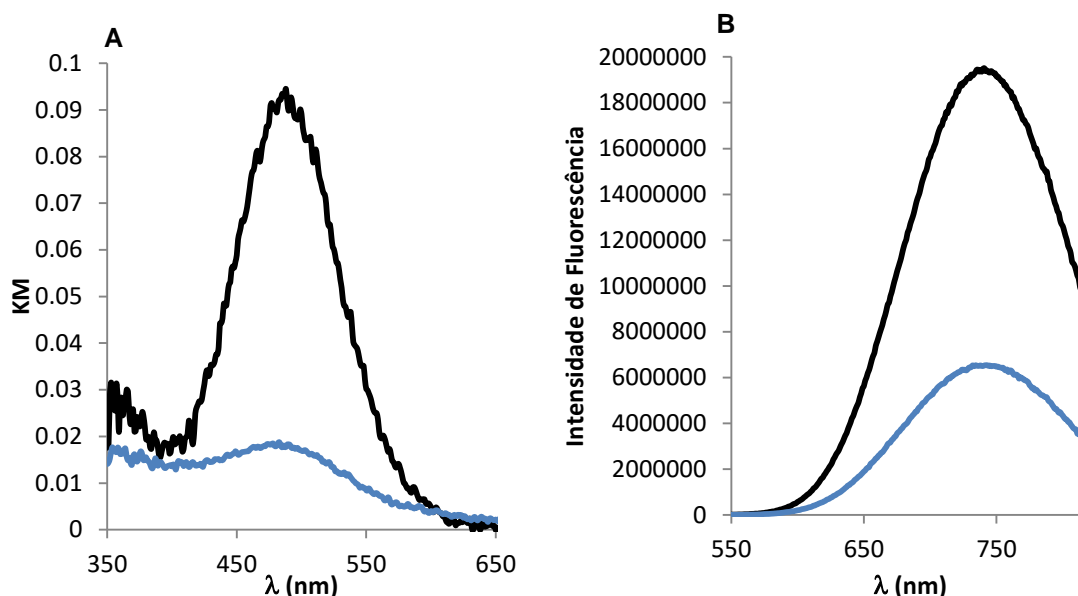


Figura 25. Espectro de absorção (A) e de fluorescência (B) das sodalites e das nano-sodalites não funcionalizada. Os espectros de absorção (A) foram adquiridos entre os 350 e os 650 nm. Os espectros de fluorescência (B) foram obtidos na gama de 550 a 820 nm, pela excitação a 475 nm. A linha preta corresponde à sodalite e a linha azul corresponde à nano-sodalite.

Pela análise da **Figura 25** foi possível verificar que a intensidade do pico de absorção (A) e do pico da fluorescência (B) das nano-sodalites é muito inferior às intensidades obtidas para as sodalites de selénio com o mesmo valor de x ($x=0,1$). Quanto à posição do pico de absorção e de emissão das nano-sodalites, verificou-se que este não sofreu nenhum desvio, comparativamente ao adquirido para as sodalites (**Figura 25**). Assim o pico máximo de absorção das nano-sodalites surge aos 490 nm e o pico máximo de emissão aparece aos 740 nm. Como não há desvio da posição do pico de emissão e de absorção da sodalite é possível concluir que *cluster* de selénio (Se_2^-) está encapsulado nas gaiolas β das nano-sodalites. Estes resultados vêm corroborar a hipótese de que a diminuição da intensidade da luminescência e da absorção deve-se há elevada presença de nefelina, identificada na **Figura 22**. A organização estrutural da nefelina impede-a de encapsular os iões de cloro e consequentemente os iões de selénio. ^{[11][15][16]} Desta forma, uma amostra com elevado teor de nefelina apresenta menor intensidade de luminescência que uma amostra completamente constituída por sodalite. Na **Figura 26** são apresentados os espectros de absorção (A) e emissão (B) das nano-sodalites não funcionalizadas (F0) e funcionalizadas (F3). A azul encontra-se representado o espectro obtido para a nano-sodalite F0 e a vermelho encontra-se representado o espectro da nano-sodalite F3.

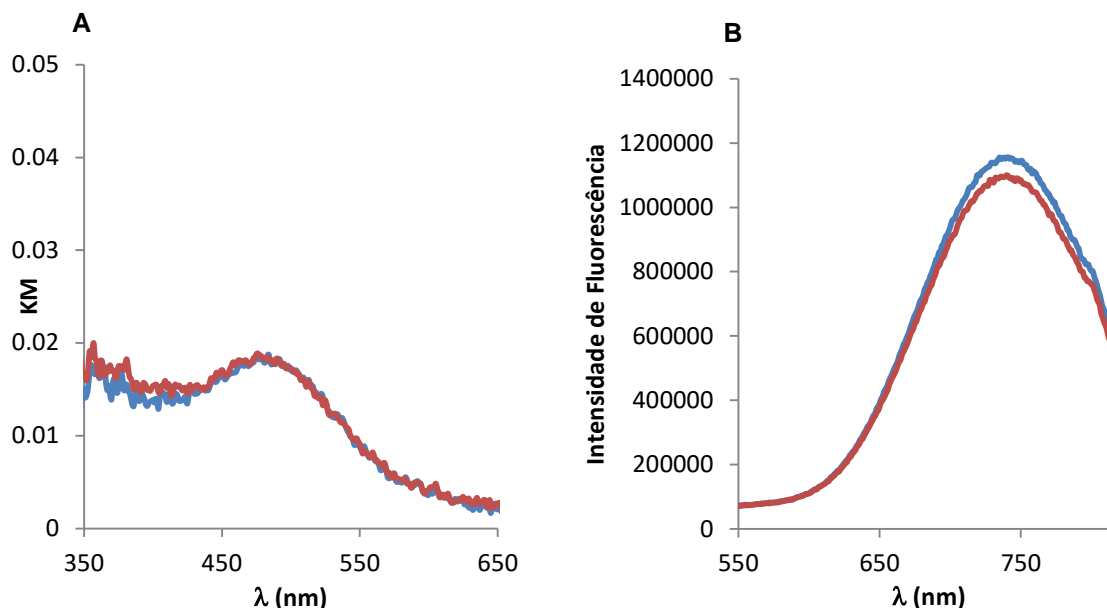


Figura 26. Espectros de absorção (A) e de fluorescência (B) das nano-sodalites. A linha azul corresponde ao espectro obtido para a nano-sodalite não funcionalizada (Nano F0) e a linha vermelha corresponde ao espectro obtido para a nano-sodalite funcionalizada (Nano F3).

Pela observação da **Figura 26** foi possível verificar que as nano-sodalites sintetizadas, não funcionalizadas (F0) e funcionalizadas (F3), não apresentam variação das suas propriedades fotoquímicas, tanto quanto à posição do pico, como quanto à intensidade máxima obtida. Como discutido anteriormente, a presença deste pico deve-se à espécie Se_2^- e significa que o *cluster* foi devidamente encapsulado no interior das nano-sodalites. Para além disso, esta inalteração dos espectros de absorção e emissão já tinha sido observada quando se caracterizou as sodalites funcionalizadas (**Figura 20**). Desta forma é possível concluir que o revestimento com o silano não influencia as propriedades fotoquímicas destes materiais.

3.5.4.2. Eficiência Quântica Externa e Brilho

Como já mencionado a Eficiência Quântica Externa (EQE) é um fator importante para caraterização de um material luminescente, como o caso das nano-sodalites de selénio, e permite determinar o brilho de um material.^[21] Na **Tabela 4** são apresentados os valores de EQE e de brilho das sodalites e nano-sodalites ($x=0,1$), funcionalizadas e não funcionalizadas.

Tabela 4. Eficiência Quântica externa (%) e brilho das sodalites e nano-sodalites, não funcionalizadas (F0) e funcionalizadas durante 3 horas (F3).

	EQE (%)		Brilho	
	Sodalite	Nano-sodalite	Sodalite	Nano-sodalite
F0	48	17	1812	615
F3	42	16	1568	604

Pela análise dos valores da **Tabela 4** é possível verificar que o EQE e o brilho das sodalites, funcionalizadas (F3) e não funcionalizadas (F0), são muito superiores aos valores obtidos para as nano-sodalites. Tendo em conta os espectros de fluorescência comparados na **Figura 25**, esta discrepância era espetável, uma vez que o EQE e o brilho estão relacionados com a intensidade de fluorescência do material. Para as sodalites e nano-sodalites a intensidade de F0 é idêntica à de F3, confirmando que a silanização não afeta a luminescência das sodalites. Com base na caracterização estrutural e fotoquímica das sodalites e nano-sodalites sintetizadas foi possível concluir que o decréscimo da luminescência das nano-sodalites, comparativamente à sodalite, deve-se à elevada contaminação por nefelina. Para contornar este problema as condições de síntese das nano-sodalites teriam de ser otimizadas.^{[11][15][16]}

3.6. Esterilização e Solubilização de sodalites

Após a síntese e caracterização das sodalites e nano-sodalites, estes materiais foram esterilizados para poderem ser utilizados em ensaios biológicos. Os compostos foram esterilizados num forno a 100 °C para reduzir a degradação do silano, cujo ponto de ebulição é aos 217 °C.^[39] Em seguida avaliou-se a capacidade de solubilização das sodalites e das nano-sodalites esterilizadas. Na **Tabela 5** encontram-se apresentados os valores de concentração máxima obtidos em DMEM, água e PBS.

Tabela 5. Concentração mássica obtida para diferentes solubilizações das funcionalizações da sodalite e nano-sodalite.

Tempo de Funcionalização (h)	[Sodalite] (mg/mL)			[Nano-sodalite] (mg/mL)		
	H ₂ O	PBS	DMEM	H ₂ O	PBS	DMEM
0	0,7	0,7	0,9	0,7	0,9	1,4
3	0,9	1,0	1,1	1,0	1,1	1,5

Pela observação da **Tabela 5** foi possível verificar que a presença do silano aumenta a capacidade de solubilização da sodalite e da nano-sodalite.^{[8][17][39]}

Relativamente aos solventes utilizados verificou-se que as nano-sodalites são mais solúveis em solventes aquosos do que as sodalites. Esta diferença de solubilização pode ser devida à diferença do tamanho da partícula, uma vez que possíveis agregados de nano-sodalite serão sempre menores do que os agregados formados pelas sodalites.^{[8][9]} Outra possibilidade é que a silanização seja mais eficiente para as nano-sodalites do que para as sodalites. Desta forma o revestimento formado em torno das nano-sodalites será mais uniforme do que o das sodalites e por isso as nano-sodalites seriam mais facilmente solubilizadas do que as sodalites.^{[17][39]} Por fim, tanto as sodalites como as nano-sodalites solubilizam mais facilmente numa solução rica em iões como o DMEM e PBS do que em água, devido à força iónica das soluções ricas em sais que facilita a solubilização de certos compostos.

3.7. Ensaios Biológicos

3.7.1. Internalização celular

O primeiro passo para iniciar a aplicação das sodalites e nano-sodalites em células animais é a avaliação da internalização das sodalites. Para avaliar a internalização das sodalites adquiriu-se os espectros de fluorescência da sodalite F3 na parte celular (fibroblastos) e no meio de cultura. O resultado deste ensaio é apresentado na **Figura 27**.

Pela análise da **Figura 27** foi possível verificar um pico de emissão máximo aos 740 nm, característico do cluster Se_2^- , o que sugere que não ocorreu degradação química das sodalites de selênio.^[9] Em termos de intensidade do pico verificou-se que a fluorescência obtida para o meio de cultura é praticamente inexistente, a passo que para a fração celular o sinal de fluorescência é elevado. Este resultado vem demonstrar que as sodalites de selênio têm preferência pela fração celular, isto é, os fibroblastos.

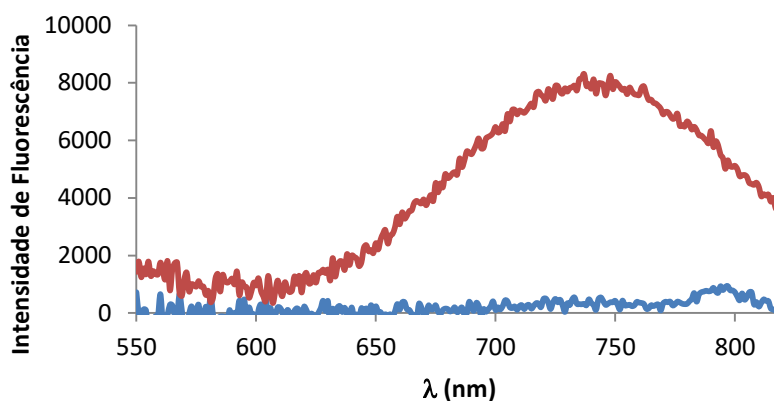


Figura 27. Espectros de fluorescência das sodalites F3 nos fibroblastos (linha vermelha) e no meio de cultura (linha azul). As células foram incubadas com sodalite de selênio funcionalizada durante 3 horas (F3), durante 48 horas e a 37 °C. Estes espectros foram obtidos pela excitação a 475 nm e a emissão foi obtida de 550 a 820 nm, com *slits* de 10 nm.

3.7.2. Viabilidade Celular

Tendo em conta este resultado passou-se à determinação da viabilidade celular para as sodalites e nano-sodalites. A viabilidade celular da sodalite foi determinada pelo ensaio de MTS, descrito no capítulo 2.6.2. O ensaio de viabilidade apresentado na **Figura 28** permitiu comparar o efeito de três sodalites ($x=0,1$; $x=0,2$ e $x=0,7$) em duas concentrações diferentes (0,15 e 0,3 mg/mL) sobre a linhagem celular de fibroblastos. Os fibroblastos foram incubados com as sodalites durante 48 horas, a 37 °C. Pela análise da **Figura 28** foi possível verificar que a viabilidade celular, para todas as sodalites utilizadas, foi cerca de 100%. Este resultado pode dever-se à baixa toxicidade de zeólitos em células humanas, como referido na bibliografia.^{[7-9][29-32]} Outra hipótese é que a sodalite pode estar adsorvida à superfície dos fibroblastos e não internalizada.

Tendo em conta que para a concentração de 0,3 mg/mL todas as viabilidades obtidas foram de cerca de 100% realizou-se um novo ensaio de viabilidade com a mesma

concentração de sodalite ($x=0,1$), funcionalizada (F3) e não funcionalizada (F0). Para além disso, avaliou a viabilidade celular dos fibroblastos quando expostos à nano-sodalite funcionalizada. Na **Figura 29** podem-se observar os resultados obtidos.

Pela análise do gráfico apresentado na **Figura 29** foi possível verificar que a funcionalização não apresenta uma influência significativa na viabilidade celular dos fibroblastos, para a sodalite. Por outro lado, as nano-sodalites apresentam uma viabilidade de cerca de 85%, ou seja, ligeiramente inferior ao valor obtido para as sodalites. Esta diferença pode ser um indício de que de facto a sodalite não consegue internalizar, ficando aderida à superfície dos fibroblastos, enquanto as nano-sodalites, devido às suas dimensões, internalizam mais facilmente e, desta forma, afetam a viabilidade celular dos fibroblastos. Para tentar responder a esta questão recorreu-se há microscopia de fluorescência.

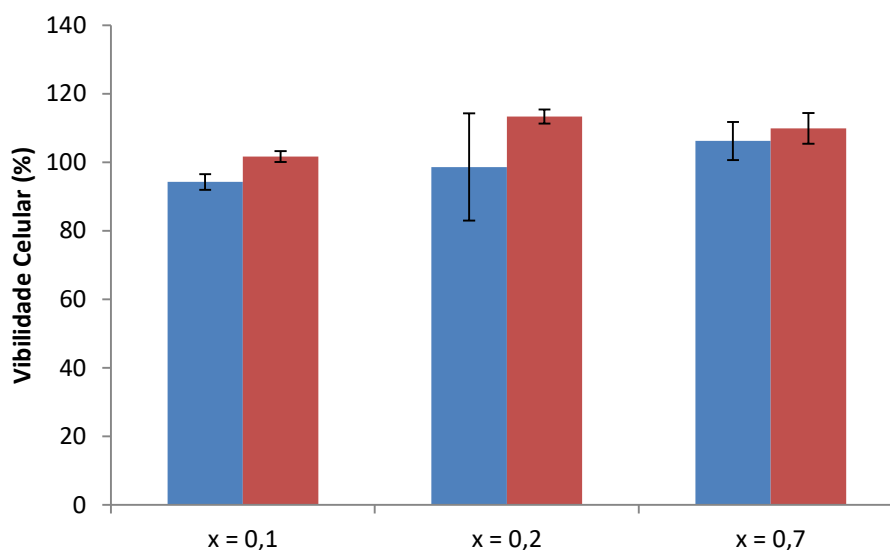


Figura 28. Viabilidade celular dos fibroblastos após exposição a diferentes sodalites. Os fibroblastos foram incubados durante 48 horas, a 37 °C com as sodalites. Avaliou-se o efeito de duas concentrações de sodalite: 0,3 mg/mL (barras azuis) e 0,15 mg/mL (barras vermelhas) e utilizou-se três sodalites com diferentes quantidades estequiométricas de selénio ($x=0,1$; $x=0,2$ e $x=0,7$).

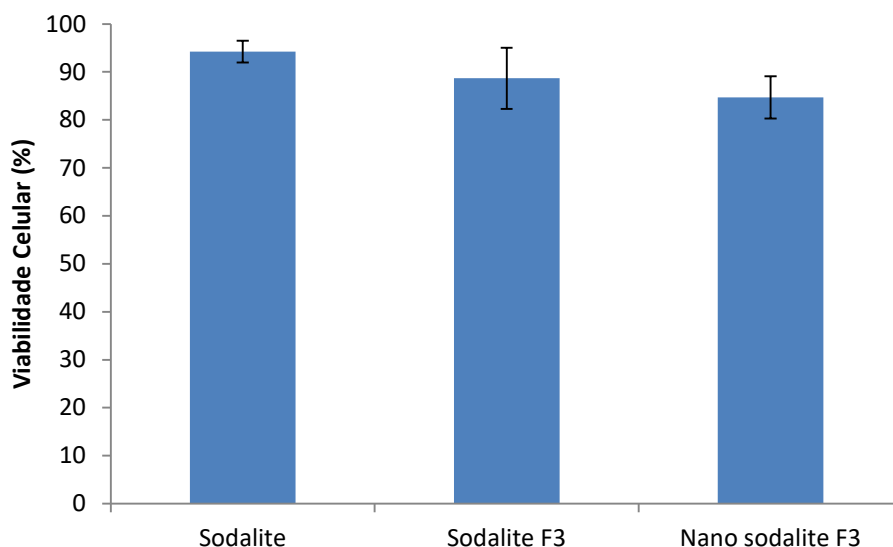


Figura 29. Viabilidade celular dos fibroblastos após 48 horas de incubação com a solução de sodalite e nano-sodalite, em DMEM, a concentração de 0,3 mg/mL. Os fibroblastos foram incubados durante 48, a 37 °C com nano-sodalite de selênio ($x=0,1$) funcionalizada e sodalite de selênio ($x=0,1$), funcionalizada e não funcionalizada.

3.7.3. Microscopia de Fluorescência

Para tentar perceber como de facto as sodalites e nano-sodalites afetam os fibroblastos realizaram-se ensaios de microscopia de fluorescência, com diferentes tempos de incubação (6, 22 e 48 horas). As imagens de microscopia foram obtidas para as sodalites funcionalizadas (F3), num microscópio de fluorescência convencional, e para as nano-sodalites funcionalizadas, num microscópio de fluorescência invertido. Na **Figura 30** são apresentadas as imagens de microscopia de fluorescência obtidas a partir da incubação da sodalite nos fibroblastos. De forma a compreender melhor a localização da sodalite, marcou-se os núcleos dos fibroblastos com Hoechst 33258.

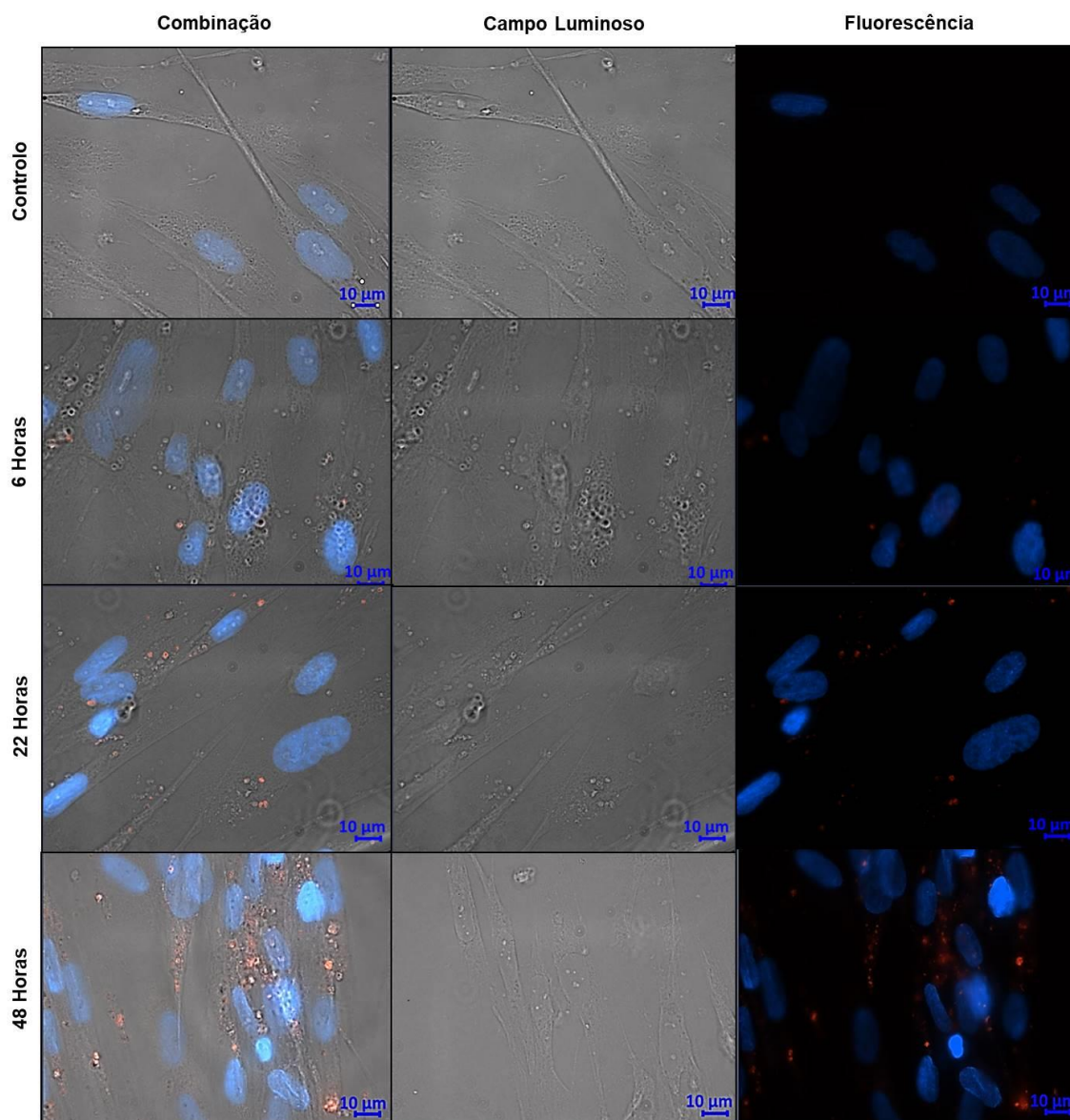


Figura 30. Imagens de microscopia de fluorescência resultantes da incubação de sodalite funcionalizada com fibroblastos, durante 6, 22 e 48 horas. As imagens foram obtidas no campo de luz clara e sob fluorescência (excitação para Hoechst 33258: 335-383 nm e excitação para a sodalite: 540-552 nm). A objetiva utilizada foi a de 100x.

Pela análise da **Figura 30** foi possível observar uma evolução da quantidade da sodalite de selênio presente nos fibroblastos. Com a marcação dos núcleos com Hoechst 33258 (azul) foi possível identificar as zonas de presença de sodalite (vermelho) nos fibroblastos. Como controlo utilizou-se células crescidas, nas mesmas condições que as restantes células, mas sem a adição da sodalite. Em termos de presença de sodalite nos diferentes tempos de incubação foi possível verificar que bastam seis horas de incubação para que as sodalites interajam com os fibroblastos. Contudo a presença de sodalite nos fibroblastos, após 6 horas de incubação, é muito diminuta, o que pode ser um indício de que as sodalites precisam de tempo para internalizarem ou adsorverem. Após 22 horas de incubação, a presença de sodalite nos fibroblastos aumenta ligeiramente e começa a surgir um padrão de localização das

sodalites Ao fim de 48 horas de incubação a presença de sodalite nos fibroblastos é evidente, sendo que as sodalites revelam tendência a localizar-se na zona próxima ao núcleo dos fibroblastos. Contudo não foi possível confirmar se as sodalites estavam adsorvidas ou internalizadas nos fibroblastos. A melhor forma de resolver esta questão seria por microscopia confocal. Todavia, o facto de estas partículas se encontrarem principalmente na zona circundante ao núcleo, poderá indicar que há uma internalização destes materiais.

Por fim, o efeito das nano-sodalites de selénio nos fibroblastos foi estudado por microscopia de fluorescência. Na **Figura 31** é possível observar a evolução da presença de nano-sodalite nos fibroblastos. Assim como anteriormente os núcleos dos fibroblastos foram marcados com Hoescht 33258 de forma a facilitar a compreensão da localização das nano-sodalites. Os tempos de incubação utilizados foram 6, 22 e 48 horas. Ao fim de 6 horas de incubação, uma pequena presença de nano-sodalite foi observada perto das extremidades dos fibroblastos. Após 22 horas de incubação, a presença de nano-sodalites aumenta drasticamente e é observada tanto na zona interna como na periferia dos fibroblastos. Esta localização pode ser um indício de que de facto as nano-sodalites interagem com a superfície dos fibroblastos. Contudo, ao fim de 48 horas, a presença de nano-sodalite é praticamente nula. Este desaparecimento das nano-sodalites pode indicar que as nano-sodalites estão apenas adsorvidas à superfície dos fibroblastos. Desta forma uma pequena mudança, como a inclinação da placa de crescimento quando de está a retirar o meio ou durante as lavagens pode remover as nano-sodalites à superfície dos fibroblastos. Outra hipótese é que as menores partículas de nano-sodalite estejam a internalizar, mas devido à sua dispersão e baixa intensidade de brilho podem não ser detetadas por microscopia de fluorescência.

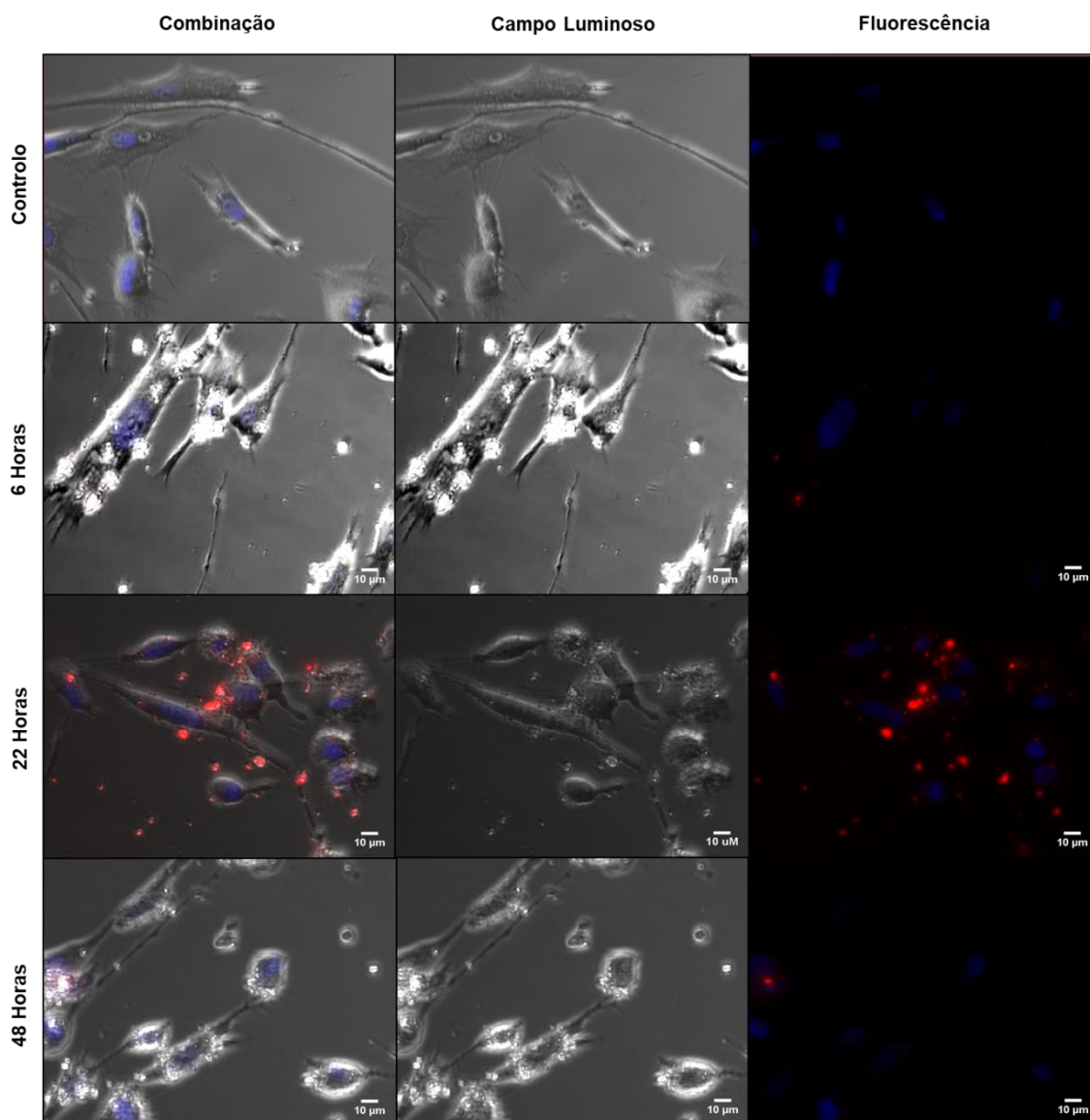


Figura 31. Imagens de microscopia de fluorescência resultantes da incubação de nanosodalites funcionalizadas em fibroblastos, durante 6, 22 e 48 horas. As imagens foram obtidas no campo de luz clara e sob fluorescência (excitação de Hoechst 33258: 340-380 nm e excitação da nanosodalite: 510-560 nm). A objetiva utilizada foi a de 40x.

4. Conclusão

Os zeólitos são aluminossilicatos porosos conhecidos pela sua versatilidade em aplicações químicas e biológicas.^[1-17] Devido à sua elevada estabilidade química e capacidade de encapsular determinadas moléculas, iões ou *clusters*, os zeólitos têm sido amplamente utilizados na área da química, como catalisadores de reações e como adsorventes moleculares, e na área da biologia, como desintoxicantes, descontaminantes e em sistemas de entrega de fármacos.^{[2][4][8][9][14][22][29-32]}

As propriedades conferidas aos zeólitos pela influência de *clusters*, iões e pequenas moléculas orgânicas encapsuladas têm sido extremamente avaliadas e as novas aplicações têm sido desenvolvidas.^{[5][8][12][13][19-25][29][34]} As áreas de maior interesse são na área da

biomedicina, com o encapsulamento de radioisótopos para obtenção de imagem de contraste em ressonância magnética,^[8] e na área de biologia, com a utilização de zeólitos como encapsuladores de moléculas ou *clusters* luminescentes para aplicações em microscopia de fluorescência.^{[9][27][28]}

A fluorescência é emissão de luz por um determinado composto ou material quando este é sujeito à excitação por parte de uma radiação com maior energia.^{[27][38]} A microscopia de fluorescência é uma técnica que utiliza compostos fluorescentes (fluoróforos) como marcadores de material biológico, sendo por isso amplamente utilizado na área da biologia.^{[27][38]} Combinando a marcação dos constituintes celulares com diferentes fluoróforos com a técnica de microscopia de fluorescência é possível diferenciar os constituintes celulares e avaliar o comportamento de determinados compostos ou proteínas em sistemas biológicos.^{[27][38]}

As sodalites (SOD) são aluminossilicatos com composição química de $\text{Na}_8[\text{AlSiO}_4]_6\text{Cl}_2$ e são completamente constituídas por gaiolas de sodalite (gaiola β).^{[11][12]} Apesar de ser um aluminossilicato cristalino, as dimensões do seu poro são inferiores às da maioria dos zeólitos, o que faz das sodalites um excelente encapsulador de iões e *clusters*.^{[11][12]}

Os calcogenetos são compostos químicos constituídos por um ou mais calcogénios. Pela alteração do estado de oxidação do calcogeneto encapsulado, é possível alterar as propriedades fotoquímicas observadas na sodalite.^{[12][18-20]} Estudos realizados anteriormente comprovaram que os *clusters* de calcogenetos do tipo X_2^- , em que $\text{X} = \text{S}, \text{Se}, \text{Te}$, são responsáveis pelo efeito de fluorescência nas sodalites.^{[12][18-20]}

De entre os *clusters* de calcogenetos o Se_2^- é o que apresenta uma gama de excitação (470 nm) próxima do comprimento de onda do laser utilizado em microscopia confocal (480 nm), sendo por isso a espécie mais indicada para este projeto.^{[18][27]} A microscopia confocal é uma técnica de microscopia de alta resolução que requer longos tempos de aquisição e energia de excitação focada num ponto específico da amostra.^[27] Estes dois fatores levam à fotodegradação da maioria dos marcadores de fluorescência. Assim, o desenvolvimento de compostos ou materiais fluorescentes resistentes à fotodegradação é essencial para a evolução desta técnica.

Esta dissertação teve como objetivo avaliar a capacidade das sodalites e nano-sodalites de selénio luminescentes como marcadores de fluorescência em sistemas *in vitro*. Para alcançar este objetivo as sodalites e nano-sodalites foram sintetizadas pelo método de síntese solida, a partir do zeólito LTA-4A, e foram caracterizadas por Difração de Raios-X (DRX), Fluorescência de Raios-X (FRX) e microscopia de luz polarizada. A caracterização das sodalites obtidas por espectroscopia de absorção e de fluorescência e a determinação da Eficiência Quântica Externa (EQE) e do brilho permitiu definir qual a sodalite de selénio mais propícia à aplicação em microscopia de fluorescência. Por isso realizaram-se ensaios *in vitro*, na linhagem de fibroblastos humanos, para determinar os efeitos citotóxicos e a localização das sodalites e nano-sodalites em células animais.

A conversão do zeólito LTA-4A em sodalite foi eficiente uma vez que se obteve sodalites com reduzida contaminação por nefelina. A nefelina é um subproduto que se forma durante a

conversão de LTA-4A em sodalite e que devido à sua estrutura tridimensional não consegue encapsular os *clusters* de selénio. Pela caracterização espectroscópica determinou-se que a sodalite com maior intensidade de brilho (1812) e Eficiência Quântica Externa (48%) foi a $\text{Na}_8(\text{AlSiO}_4)_6\text{Se}_{0,1}\text{Cl}_{1,9}$. Com base na otimização da síntese das sodalites luminescentes sintetizou-se as nano-sodalites. Por DRX verificou-se que as nano-sodalites obtidas apresentavam elevada contaminação por nefelina. Este problema deveu-se às condições de síntese e influenciou a luminescência das nano-sodalites. Assim, as nano-sodalites sintetizadas apresentaram 17% de EQE e um brilho de 615, que é cerca de metade do valor obtido para as sodalites com a mesma quantidade estequiométrica de selénio. Através da comparação de ambas as sodalites e nano-sodalites resultantes da síntese sólida, foi possível verificar que possuem propriedades estruturais diferentes. Assim sendo, para alcançar nano-sodalites com maior pureza e luminescência as condições de síntese devem ser otimizadas, em termos de tempo e temperatura de sinterização.

Através deste estudo verificou-se que é possível encapsular o *cluster* de Se_2^- na estrutura da sodalite a partir do zeólito LTA-4A. O *cluster* de selénio encapsulado influencia as propriedades fotoquímicas da sodalite. A sodalite perdeu luminescência para concentrações de selénio elevadas. Este efeito deve-se à formação de um novo *cluster* cujo máximo de emissão está centrado no gama do infravermelho. Este *cluster* ainda não foi identificado mas o mais plausível será o Se_4^{2-} . As nano-sodalites apenas foram sintetizadas após a otimização de todos os passos de síntese da sodalite. Em termos estruturais as nano-sodalites obtidas estavam contaminadas com nefelina e como tal exibiam intensidade de luminescência reduzida. Desta forma para o mesmo valor estequiométrico de selénio ($x=0,1$) as nano-sodalites exibiam um EQE de 17% (EQE sodalite $x=0,1$: 48%). Esta diminuição deve-se principalmente ao facto que o subproduto da síntese de sodalite (nefelina) não ter capacidade de encapsulamento de *clusters* como a sodalite.

As sodalites e nano-sodalites obtidas foram silanizadas com APTES ((3-aminopropil)triétoxissilano), para facilitar a internalização nos fibroblastos. Os tempos de reação avaliados foram 1 e 3 horas e, após a determinação do rácio N/C e da caracterização espectroscópica, determinou-se que o tempo indicado para a silanização completa de sodalite seria de 3 horas. Para este tempo de reação foi obtido o rácio de N/C mais próximo do esperado (obtido: 0,21, esperado: 0.33). A influência da silanização na EQE e brilho da sodalite encontrada para este tempo de reação foi mínima.

A citotoxicidade foi determinada em sistema celular *in vitro*. A linhagem celular utilizada para o estudo da citotoxicidade das sodalites e aplicação em microscopia de fluorescência foi a linhagem dos fibroblastos. Após incubação de 48 horas conclui-se que as sodalites e nano-sodalites não causavam qualquer efeito tóxico nesta linhagem celular. A viabilidade celular obtida para a sodalite foi de 100% e para a nano-sodalite foi de 85%. Esta diferença pode advir da capacidade das nano-sodalites de interagir com as células devido as suas dimensões. Em termos de microscopia de fluorescência as sodalites foram sempre observáveis. Realizaram-se ensaios de microscopia de fluorescência com tempos de

incubação de 6, 22 e 48 horas, onde se observou um aumento da presença das sodalites luminescentes na zona celular. Uma vez que não se realizou microscopia confocal não foi possível averiguar se as sodalites internalizavam ao se estavam adsorvidas à superfície dos fibroblastos. Desta forma é possível afirmar que o objetivo desta dissertação foi concretizado.

Apesar de este estudo ter contribuído para a otimização da síntese destes materiais, para a caracterização espectroscópica do *cluster* Se_2^- e para caracterização dos efeitos biológicos deste composto, ainda há muito a ser explorado. As condições de síntese das nano-sodalites, como a temperatura, o tempo de reação e as quantidades estequiométricas dos reagentes, necessitam de ser otimizadas. Novos revestimentos podem ser testados para aumentar a seletividade das nano-sodalites em sistemas biológicos. Em termos aplicações bioquímicas, muitos estudos podem ser desenvolvidos. Aproveitando a estabilidade e luminescência destes compostos, as nano-sodalites podem ser utilizadas como marcadores para entrega de fármacos. Para além disso, seria de grande interesse avaliar a estabilidade deste marcador de fluorescência em outras técnicas microscópicas, como microscopia confocal. Assim este trabalho representa apenas o início de várias oportunidades para a aplicação das sodalites e nano-sodalites luminescentes de selénio na área da biologia, bioquímica e biomedicina.

5. Bibliografia

- [1] - Baerlocher, C., McCusker, L. B., & Olson, D. H. (2007). Atlas of zeolite framework types. Elsevier
- [2] - Payra, P., Dutta, P. K. (2003). Zeolites: a primer. Handbook of zeolite science and technology, 1-19.
- [3] - Cheung, O., Hedin, N. (2014). Zeolites and related sorbents with narrow pores for CO₂ separation from flue gas. Rsc Advances, 4(28), 14480-14494.
- [4] - Ferreira, L. S. P. (2012). Desenvolvimento de embalagens alimentares poliméricas com propriedades antimicrobianas (Master's dissertation).
- [5] - Lin, H., Fujii, M. (2016). Luminescent Zeolites. In Zeolites-Useful Minerals. InTech.
- [6] - Hanim, S. A. M., Malek, N. A. N. N., Ibrahim, Z. (2016). Amine-functionalized, silver-exchanged zeolite NaY: Preparation, characterization and antibacterial activity. Applied Surface Science, 360, 121-130.
- [7] - Mayer, F., Zhang, W., Brichart, T., Tillement, O., Bonnet, C. S., Tóth, É., Djanashvili, K. (2014). Nanozeolite-LTL with GdIII Deposited in the Large and EuIII in the Small Cavities as a Magnetic Resonance Optical Imaging Probe. Chemistry-A European Journal, 20(12), 3358-3364.
- [8] - Męczyńska-Wielgosz, S., Piotrowska, A., Majkowska-Pilip, A., Bilewicz, A., Kruszewski, M. (2016). Effect of Surface Functionalization on the Cellular Uptake and Toxicity of Nanozeolite A. Nanoscale research letters, 11(1), 123.
- [9] - Zhuang, J., Kuo, C. H., Chou, L. Y., Liu, D. Y., Weerapana, E., Tsung, C. K. (2014). Optimized metal-organic-framework nanospheres for drug delivery: evaluation of small-molecule encapsulation. ACS nano, 8(3), 2812-2819.
- [10] - Tsapatsis, M., Lovallo, M., Okubo, T., Davis, M. E., Sadakata, M. (1995). Characterization of zeolite L nanoclusters. Chemistry of materials, 7(9), 1734-1741.
- [11] - Ding, L., Yang, H., Rahimi, P., Omotoso, O., Friesen, W., Fairbridge, C., Ng, S. (2010). Solid transformation of zeolite NaA to sodalite. Microporous and Mesoporous Materials, 130(1-3), 303-308.
- [12] - Sidike, A., Sawuti, A., Wang, X. M., Zhu, H. J., Kobayashi, S., Kusachi, I., Yamashita, N. (2007). Fine structure in photoluminescence spectrum of S²⁻ center in sodalite. Physics and Chemistry of Minerals, 34(7), 477-484.
- [13] - Zahoransky, T., Friis, H., Marks, M. A. (2016). Luminescence and tenebrescence of natural sodalites: a chemical and structural study. Physics and Chemistry of Minerals, 43(7), 459-480.
- [14] - Rahmani, S., Azizi, S. N., Asemi, N. (2016). Application of Synthetic Nanozeolite Sodalite in Drug Delivery. International Current Pharmaceutical Journal, 5(6), 55-58.
- [15] - Kahlenberg, V., Bohn, H. (1998). Crystal structure of hexagonal trinepheline; a new synthetic NaAlSiO₄ modification. American Mineralogist, 83(5-6), 631-637.
- [16] - Tait, K. T., Sokolova, E., Hawthorne, F. C., Khomyakov, A. P. (2003). The crystal chemistry of nepheline. The Canadian Mineralogist, 41(1), 61-70.

- [17] - Petushkov, A. (2011). Synthesis and characterization of nanocrystalline and mesoporous zeolites. The University of Iowa.
- [18] - Williams, E. R., Simmonds, A., Armstrong, J. A., Weller, M. T. (2010). Compositional and structural control of tenebrescence. *Journal of Materials Chemistry*, 20(48), 10883-10887.
- [19] - Choi, J., Heo, J., Choi, Y. G., Chung, W. J. (2012). Visible light emission from selenium color centers formed in silicate glasses. *Optical Materials*, 34(7), 1231-1234.
- [20] - Schlaich, H., Lindner, G. G., Feldmann, J., Göbel, E. O., Reinen, D. (2000). Optical Properties of Se²⁻ and Se₂ Color Centers in the Red Selenium Ultramarine with the Sodalite Structure. *Inorganic chemistry*, 39(13), 2740-2746.
- [21] - Coutino-Gonzalez, E., Roeffaers, M. B., Dieu, B., De Cremer, G., Leyre, S., Hanselaer, P., Hofkens, J. (2013). Determination and optimization of the luminescence external quantum efficiency of silver-clusters zeolite composites. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(14), 6998-7004.
- [22] - Shameli, K., Ahmad, M. B., Zargar, M., Yunus, W. M. Z. W., Ibrahim, N. A. (2011). Fabrication of silver nanoparticles doped in the zeolite framework and antibacterial activity. *International journal of nanomedicine*, 6, 331.
- [23] - Sun, T., Seff, K. (1994). Silver clusters and chemistry in zeolites. *Chemical reviews*, 94(4), 857-870.
- [24] - De Cremer, G., Coutino-Gonzalez, E., Roeffaers, M. B., Moens, B., Ollevier, J., Van der Auweraer, M., De Vos, D. E. (2009). Characterization of fluorescence in heat-treated silver-exchanged zeolites. *Journal of the American Chemical Society*, 131(8), 3049-3056.
- [25] - Norrbo, I., Gluchowski, P., Paturi, P., Sinkkonen, J., Lastusaari, M. (2015). Persistent luminescence of tenebrescent Na₈Al₆Si₆O₂₄(Cl, S)₂: multifunctional optical markers. *Inorganic chemistry*, 54(16), 7717-7724.
- [26] - Robson, H. (2001). Verified synthesis of zeolitic materials. Gulf Professional Publishing.
- [27] - Hashimoto, S., Moon, H. R., & Yoon, K. B. (2007). Optical microscopy study of zeolite-dye composite materials. *Microporous and mesoporous materials*, 101(1-2), 10-18.
- [28] - Fine, A. (2007). *Confocal Microscopy: Principles and Practice*. Cold Spring Harbor Protocols, 2007(10), pdb-top22.
- [29] - Li, Z., Hüve, J., Krampe, C., Luppi, G., Tsotsalas, M., Klingauf, J., Riehemann, K. (2013). Internalization Pathways of Anisotropic Disc-Shaped Zeolite L Nanocrystals with Different Surface Properties in HeLa Cancer Cells. *Small*, 9(9-10), 1809-1820.
- [30] - Gueudré, L., Binder, T., Chmelik, C., Hibbe, F., Ruthven, D. M., Kärger, J. (2012). Micro-imaging by interference microscopy: A case study of orientation-dependent guest diffusion in MFI-type zeolite host crystals. *Materials*, 5(4), 721-740.
- [31] - Marega, R., Prasetyanto, E. A., Michiels, C., De Cola, L., Bonifazi, D. (2016). Fast Targeting and Cancer Cell Uptake of Luminescent Antibody-Nanozeolite Bioconjugates. *Small*, 12(39), 5431-5441.

- [32] - Soldatkin, O. O., Shelyakina, M. K., Arkhypova, V. N., Soy, E., Kirdeciler, S. K., Kasap, B. O., Dzyadevych, S. V. (2015). Nano-and micro-sized zeolites as a perspective material for potentiometric biosensors creation. *Nanoscale research letters*, 10(1), 59.
- [33] - Terai, T., Nagano, Tetsuo (2013). Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging, *Pflugers Arch*, 465(3), 347-59
- [34] - Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S. J. J. L., Li, J. J., Weiss, S. (2005). Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *science*, 307(5709), 538-544.
- [35] - Khaledi-Nasab, A., Sabaeian, M., Sahrai, M., Fallahi, V. (2014). Kerr nonlinearity due to intersubband transitions in a three-level InAs/GaAs quantum dot: the impact of a wetting layer on dispersion curves. *Journal of Optics*, 16(5), 055004.
- [36] - Shahzadeh, M., Sabaeian, M. (2014). The effects of wetting layer on electronic and optical properties of intersubband P-to-S transitions in strained dome-shaped InAs/GaAs quantum dots. *AIP Advances*, 4(6), 067113.
- [37] - Chopra, N., Gavalas, V. G., Bachas, L. G., Hinds, B. J., Bachas, L. G. (2007). Functional one-dimensional nanomaterials: applications in nanoscale biosensors. *Analytical Letters*, 40(11), 2067-2096.
- [38] - Lichtman, J.W., Concello, J-A. (2005). Fluorescence microscopy, Nature Publishing Group, *Nature Methods*, Vol2.Nº12, pag: 910-919.
- [39] - Howarter, J. A., Youngblood, J. P. (2006). Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir*, 22(26), 11142-11147.
- [40] - Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L. (2016). Cell viability assays.
- [41] - Gispert, J. R. (2008). Coordination chemistry (Vol. 483). Weinheim: Wiley-VCH.
- [42] - Van Hooff, J. H. C., & Roelofsen, J. W. (1991). Techniques of zeolite characterization. In *Studies in Surface Science and Catalysis* (Vol. 58, pp. 241-283). Elsevier.
- [43] - Nikon Microscopy U: www.microscopyu.com/techniques/polarized-light/polarized-light-microscopy - 3 de Fevereiro de 2017.
- [44] - Torrent, J. O. S. É., Barron, V. (2008). Diffuse reflectance spectroscopy. *Methods of soil analysis*. Part, 5, 367-387.
- [45] - Kubelka, P. (1931). The kubelka-munk theory of reflectance. *Z Tech Phys*, 12, 539.
- [46] - Darmady, E. M., Hughes, K. E. A., Jones, J. D., Prince, D., & Tuke, W. (1961). Sterilization by dry heat. *Journal of Clinical Pathology*, 14(1), 38-44.
- [47] - Driskell, R. R., Watt, F. M. (2015). Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends in cell biology*, 25(2), 92-99.
- [48] - Smith JL (1852). "The inverted microscope-a new form of microscope". *Am J Sci Arts*. 14: 233-241.
- [49] - Pospíšil, J., Hrdý, J., Hrdý Jr, J. (2007). Basic methods for measuring the reflectance color of iron oxides. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*, 118(6), 278-288.

6. Anexos

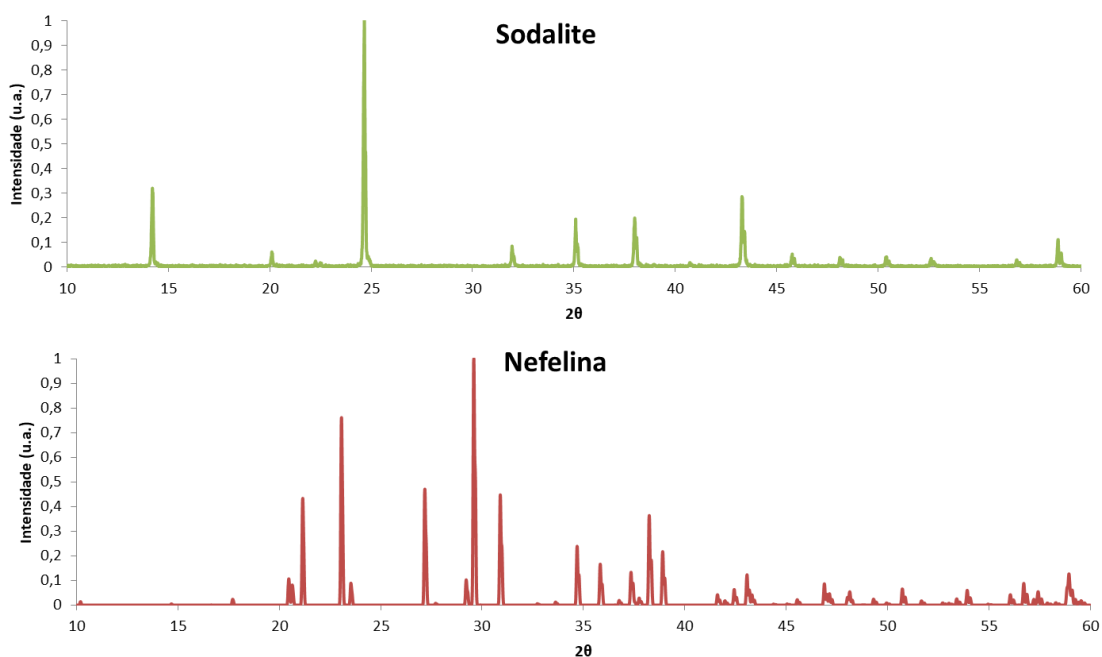


Figura 1. Espectros de Difração de Raios-X da Sodalite e da Nefelina. Estes espectros foram adquiridos como referido no capítulo 2.2.1.

Tabela 1. Valores mássicos (%) de azoto (N), carbono (C) e hidrogénio (H) obtidos para os diferentes tempos de silanização (F0: sem funcionalização; F1: 1 hora e F3: 3 horas de reação) da sodalite $x=0,1$.

	MM (g/mol)	Reação Completa	F0 (% mássica)	F1 (% mássica)	F3 (% mássica)
N	14	1	0	0,09	0,38
C	12	3	0,14	0,45	1,41
H	1	-----	0	0	0
N/C	-----	0,33	0	0,17	0,21